



Contribution des phosphodiesterases 3 et 4 au maintien de l'homéostasie calcique et à la prévention des arythmies ventriculaires dans le cardiomyocyte adulte

Pierre Bobin

► To cite this version:

Pierre Bobin. Contribution des phosphodiesterases 3 et 4 au maintien de l'homéostasie calcique et à la prévention des arythmies ventriculaires dans le cardiomyocyte adulte. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA114821 . tel-01337420

HAL Id: tel-01337420

<https://theses.hal.science/tel-01337420>

Submitted on 26 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

DISCIPLINE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

ANNÉE 2014 - 2015

SÉRIE DOCTORAT N°

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 25/06/2015

par

Pierre BOBIN

Contribution des phosphodiesterases 3 et 4 au maintien
de l'homéostasie calcique et à la prévention des
arythmies ventriculaires dans le cardiomyocyte adulte

Directeur de thèse : Grégoire VANDECASTEELE

Directeur de Recherche INSERM
(Université Paris-Sud)

Co-directeur de thèse : Jérôme LEROY

Maître de Conférence des Universités
(Université Paris-Sud)

Composition du jury :

Président du jury : Jean-Louis PAUL

Professeur des Universités
(Université Paris-Sud), Praticien
Hospitalier

Rapporteurs : Patrick BOIS

Professeur des Universités
(Université de Poitiers)

Franck LEZOUALC'H

Directeur de Recherche INSERM
(Université Paul Sabatier)

Examineurs : Catherine PAVOINE

Chargée de Recherche INSERM
(Université Pierre et Marie Curie)

Guillaume PIDOUX

Chargé de Recherche INSERM
(Université Paris Descartes)

Catherine RUCKER-MARTIN

Chercheur (Centre Chirurgical Marie-
Lannelongue)

Remerciements

La thèse est une expérience à part qui marque la fin des études et la transition vers le monde de la recherche « chez les grands », une certaine forme d'adolescence scientifique au cours de laquelle nous acquérons le bagage scientifique et technique nous permettant de nous lancer dans le « grand bain ». La réalisation de ma thèse m'a beaucoup apporté, tant sur le plan personnel que professionnel, c'est pourquoi je tiens à remercier l'ensemble des personnes que j'ai côtoyées lors de ces quatre années et qui ont participé à ma réussite.

Je tiens tous d'abord à remercier les membres du jury qui me font l'honneur de juger ma thèse. Je remercie en premier lieu le Professeur Patrick Bois et le Docteur Franck Lezoualc'h de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le Professeur Jean-Louis Paul de présider ce jury. Mes remerciements s'adressent également au Docteur Catherine Pavoine, au Docteur Guillaume Pidoux et au Docteur Catherine Rücker-Martin qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'ai réalisé mes travaux de thèse au sein de l'U769-U1180 dont je voudrais remercier l'ensemble des personnes que j'y ai rencontré.

Mes premiers remerciements s'adressent aux trois membres du laboratoire qui ont joué un rôle central dans la réussite de ma thèse :

Je tiens à remercier Rodolphe Fischmeister qui m'a permis de réaliser ma thèse dans ce laboratoire qu'il dirigeait lorsque je suis arrivé. Merci Rodolphe pour ta confiance et ton soutien lors de ma thèse, pour les idées et réflexions constructives qui ont contribué à rendre mon projet si intéressant, pour ton soutien dans la recherche des financements qui m'ont permis de le finaliser, et pour la poursuite de l'aventure jusqu'à la fin de l'année. Merci aussi de m'avoir emmené dans tes valises en Suisse et aux USA, sur la côte ouest puis sur la côte est. Ma participation à chacun de ces congrès, très intéressante sur le plan culturel, a également été - et c'est bien le but principal - très enrichissante pour moi sur le plan scientifique.

Je remercie tout particulièrement mes deux directeurs de thèse, Grégoire Vandecasteele et Jérôme Leroy. Merci à vous deux pour votre encadrement, votre soutien, le partage de vos nombreuses connaissances et de votre enthousiasme. Merci à toi Grégoire pour ta gentillesse, ton écoute, ton aide dans l'orientation du projet, pour ta disponibilité et tes précieux conseils aussi bien pour les expériences que pour la rédaction des projets, des posters et de la thèse. Merci à toi Jérôme pour ta sympathie, ta disponibilité hors-normes malgré un emploi du temps toujours plein, l'aide que tu m'as apportée à chaque instant, pour tes précieux conseils au quotidien. Je vous remercie de m'avoir permis de développer ce projet, d'avoir continué à me soutenir malgré les difficultés rencontrées à certains moments, et de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux en de nombreuses occasions. Ce fut un plaisir de réaliser ma thèse sous votre co-direction.

Je remercie également les personnes qui se sont impliquées pour m'épauler dans la réalisation de mon projet, merci Audrey pour ton aide précieuse, pour tout ce temps passé à mes côtés pour m'apprendre et mettre au point les manipes de biochimie, merci aussi Flo pour tes dissoc' d'une qualité inégalée, même le niveau supérieur ne t'a pas résisté avec des dissoc' de cochon donnant toujours au moins quelques cellules, t'es une championne ! J'en profite pour te remercier une nouvelle-fois, Catherine, pour m'avoir fait profiter de l'opportunité de travailler sur des cellules de cochon, c'était un challenge très intéressant sur le plan scientifique qui m'a accoutumé par la même occasion à enchaîner les nuits-blanches, ce qui s'est avéré utile en fin de thèse ! Comment ne pas remercier ici mon équipier pour les 24h-cochon (qui après son départ ont évolué vers les 48h-cochon) ? Merci Amir pour ton humour qui ont fait de ces marathons-du-cochon réalisés sous les tropiques (30°C à l'ombre !) des moments de franche rigolade.

Je remercie également super-Patrick a qui aucun problème informatique ne résiste, merci pour ton aide si précieuse pour « dompter » les installations de Ionoptix et de FRET. Merci aussi à toi Philippe, pour ton aide lors de notre essai de cœurs perfusés-congelés, je n'aurai jamais préparé autant d'Iso pour une manipe ! Y por fin, gracias a Ana-María y Anna por enseñarme el registro de los Ca^{2+} sparks con el confocal.

Je souhaite également exprimer ici mon toute mon amitié pour tous les collègues de bureau que j'ai pu côtoyer pendant ces années. Tout d'abord la « Dream-team du Burex » pour qui les réunions d'équipe se préparaient dans la bonne humeur jusque très tard le jeudi : mon irremplaçable partenaire de badminton/volley/football et compatriote Picto-Charentais Fabio, la bienveillante « maman » Zeineb qui m'a appris le FRET et avec qui nous partagions de longues soirées de manip', ma formatrice et acolyte du Ionoptix Hind, aussi à l'aise en PDE2 qu'au basket (mais un peu moins au volley...), Vincent, docteur en médecine et maître-ès-humour du bureau, et Aziz-le-zen le spécialiste des ACs. Je remercie aussi très chaleureusement les « jeunes » qui ont depuis pris le pouvoir dans le bureau des étudiants : Milia, le clown du bureau, merci pour ton aide pour remplir le cahier rouge (je sais... « ça s'fait pas ! »), surtout prends soin de l'ordi *Ligugé*, j'y tiens ! ; Ibrahim (Bédouine pour les intimes), notre « Ibra » de la PKA qui jongle avec les techniques scientifiques comme avec le ballon au foot-en-salle ; Marta, la petite blonde avec ses petites cigarettes et son énorme voiture qui nous a fait croire pendant des semaines qu'elle ne parlait pas français ; Liang, notre Mister No-no-no-no-no qui ne perd jamais le sourire ; Germain, Dieu du lasergame ; Sarah-I et sa bonne humeur communicative ; et Delphine, mon guide de San Francisco à l'énergie débordante, la « petite dernière » venue nous chaperonner.

Je remercie également les autres membres de l'équipe 2, et tout particulièrement les chefs de l'équipe des tuyaux, Véro et Boris, qui m'ont permis de faire de l'enseignement quand aucun poste de moniteur n'était disponible, merci beaucoup à vous deux. Merci aussi à Catherine et son groupe PDE-mito et à Bertrand pour les discussions scientifiques.

Je remercie aussi les autres membres du labo qui ont contribué à faire régner cette atmosphère si importante pour se sentir bien à l'U769-U1180, Françoise, la « maman » des doctorants, Sophie pour son travail ô-combien important, Dom pour les cours de généalogie, et puis les jeunes, Jéjé et sa guitare (allez Chamois !!!), Giada et son accent italien, Fanny la cinéaste-photographe et plus généralement toutes les personnes des équipes 1 et 3 que je n'oublie pas non-plus.

J'ai une pensée pour mes amis, Jérémy, Marie, Rémi, Elodie, Damien, Julien, Sarah, qui m'accompagnent dans mes études depuis la maternelle pour l'un, depuis le lycée ou la fac pour les autres, et qui me permettent chaque fois de décompresser quand il le faut.

Un grand merci à toi, Laure, pour m'avoir soutenu dans les périodes difficiles, m'avoir donné du courage, et aussi m'avoir (bien) nourri en particulier pendant les moments où je n'avais pas trop le temps. Merci pour ta présence et ton soutien qui m'ont énormément aidé pour ce travail.

Je souhaite également remercier et exprimer toute ma reconnaissance à ma famille, et en particulier ma sœur Léa et mes grands-parents pour leur soutien à chaque instant.

Enfin, je dédie ce travail à mes parents, qui m'ont toujours soutenu et poussé à aller de l'avant dans mes études comme sur le plan personnel. Ce travail est aussi le fruit de votre investissement à mes côtés, je vous remercie du fond du cœur de m'avoir soutenu pour me permettre d'être arrivé jusque là aujourd'hui.

Liste des figures

- Figure 1** : Faisceaux de conduction de l'influx électrique cardiaque et potentiels d'action
- Figure 2** : Couplage excitation-contraction dans un myocyte ventriculaire
- Figure 3** : Représentation schématique du canal calcique de type L (LTCC)
- Figure 4** : Illustration schématique du récepteur de la ryanodine RyR2 et du complexe macromoléculaire
- Figure 5** : Ultrastructure d'un myocyte cardiaque
- Figure 6** : Structure schématique du sarcomère
- Figure 7** : Le cycle des ponts actine-myosine
- Figure 8** : Régulation Ca^{2+} -dépendante de l'interaction actine-myosine
- Figure 9** : Voie canonique de signalisation des récepteurs β -AR
- Figure 10** : Désensibilisation des récepteurs β -AR
- Figure 11** : Structure schématique des adénylate cyclases transmembranaires (AC)
- Figure 12** : Représentation schématique de la PKA et de son activation
- Figure 13** : Schéma des complexes PKA-AKAP majeurs associés à des protéines intervenant dans la voie de signalisation β -AR et/ou le CEC cardiaque
- Figure 14** : Représentation de la structure et de l'activation des protéines Epac
- Figure 15** : Schéma des effets cardiaques d'Epac
- Figure 16** : Structures schématiques des onze familles de phosphodiésterases (PDE)
- Figure 17** : Structure des isoformes de PDE3
- Figure 18** : Les trois groupes d'isoformes de PDE4
- Figure 19** : Structure et modes d'activation de la CaMKII
- Figure 20** : Schéma des mécanismes d'activation de la CaMKII lors d'une stimulation β -adrénergique et effets de son activation sur le CEC et le CET dans le cœur
- Figure 21** : Perturbations de l'homéostasie Ca^{2+} , DADs, arythmies et pathologie : rôles du NCX, de I_{K1} et des effets d'une stimulation β -AR sur l'activité de la SERCA2a
- Figure 22** : Spectre d'excitation du Fura-2 : double excitation/mono émission
- Figure 23** : Schéma de l'installation du système IonOptix
- Figure 24** : Montage expérimental permettant la mesure de Ca^{2+} avec la sonde Fura-2

Figure 25 : Mesure simultanée du raccourcissement cellulaire et des transitoires calciques déclenchées par des stimulations électriques (5V, 4 ms) à la fréquence de 1 Hz sur un cardiomyocyte ventriculaire isolé de rat chargé avec 1 μ M de Fura-2 AM

Figure 26 : Détermination des paramètres d'amplitude et de cinétique pris en compte dans l'analyse des signaux de contraction et de transitoire Ca^{2+}

Figure 27 : Détermination de la fuite et de la charge en Ca^{2+} du RS

Figure 28 : Schéma du dispositif expérimental et de la chaîne d'acquisition utilisés pour les expériences réalisées par la technique de patch clamp

Figure 29 : Protocole expérimental utilisé pour l'enregistrement par la technique de patch clamp de potentiels d'action et du potentiel membranaire de cardiomyocytes ventriculaires de rat

Figure 30 : Schéma du principe et des conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une Vénus)

Figure 31 : Montage expérimental permettant la mesure de FRET

Figure 32 : Fonctionnement de la sonde FRET AKAR3

Figure 33 : Schéma de fonctionnement de la sonde FRET H187

Liste des tables

Table 1 : Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

Table 2 : Composition des milieux de culture utilisés pour la culture de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte et de cochon

Table 3 : Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de cochon

Table 4 : Composition des solutions de Ringer utilisées dans les expériences de mesure de la transitoire Ca^{2+} , du raccourcissement cellulaire, de la fuite et de la charge de Ca^{2+} du RS

Table 5 : Composition des solutions utilisées dans les expériences de mesure de PA et du potentiel de membrane de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

Table 6 : Agents pharmacologiques utilisés dans les expériences associés à leur propriété et leur(s) concentration(s) d'utilisation

SOMMAIRE

RESUME.....	4
ABSTRACT.....	5
ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	10
I. LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION (CEC) CARDIAQUE	10
A. <i>Le potentiel d'action (PA) : déclencheur du CEC</i>	11
B. <i>Le rôle central du Ca²⁺ dans le CEC</i>	13
1. Principe du CICR	14
2. Induction du CICR par le LTCC	14
3. Rôle prépondérant du RyR2 dans l'augmentation de la concentration de Ca ²⁺ cytosolique.....	20
4. Ca ²⁺ et contraction : les myofilaments et leur fonctionnement	24
5. Terminaison des signaux Ca ²⁺ et relaxation.....	29
a) Repompage du Ca ²⁺ dans le RS : rôle de SERCA et du PLB	30
b) Extrusion du Ca ²⁺ , NCX, PMCA et mitochondries	31
c) Relaxation	33
II. REGULATION NEURO-HORMONALE DU CEC : LA VOIE DE L'AMPC DANS LE CŒUR	33
A. <i>Synthèse de l'AMPC</i>	34
1. Les récepteurs β-adrénergiques.....	35
a) Structure et fonctionnement	35
b) Régulation du CEC	36
c) Désensibilisation	39
2. Les adénylate cyclases : le siège de la synthèse d'AMPC	41
B. <i>Effecteurs de l'AMPC</i>	43
1. La protéine kinase dépendante de l'AMPC (PKA)	44
a) Structure et régulation de la PKA	44
b) Protéines associées : les AKAP	46
c) Actions de la PKA sur ses cibles.....	48
2. Le facteur d'échange des petites protéines G (Epac)	53
a) Structure et régulation d'Epac	53
b) Action d'Epac dans le cœur	54
3. Canaux HCN	58
C. <i>Mécanismes de terminaison des signaux AMPC dans le cœur</i>	59
1. Phosphodiesterases des nucléotides cycliques (PDE)	60
2. Compartimentation spatiale des PDE dégradant l'AMPC dans le myocyte cardiaque.....	62
a) PDE1	62
b) PDE2	63
c) PDE3	64
d) PDE4	67
e) PDE8	71

III.	LA CAMKII : UNE AUTRE PROTEINE KINASE REGULANT LE CEC	72
A.	<i>Structure et régulation de la CaMKII</i>	72
B.	<i>Actions de la CaMKII sur ses cibles impliquées dans la régulation du CEC</i>	75
IV.	VOIES DE L'AMPC, DEREGULATION DU CEC ET ARYTHMIES	79
OBJECTIFS		85
MATERIEL ET METHODES		87
I.	MODELES ANIMAUX.....	87
A.	<i>Rats adultes</i>	87
B.	<i>Cochons</i>	87
II.	ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES ET CULTURE CELLULAIRE PRIMAIRE	87
A.	<i>Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte</i>	88
1.	Dissociation du cœur	88
2.	Culture des cardiomyocytes ventriculaires	89
B.	<i>Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de cochon</i>	90
C.	<i>Infection adénovirale</i>	91
III.	MESURE DE LA TRANSITOIRE Ca^{2+} , DU RACCOURCISSEMENT CELLULAIRE, DE LA FUITE ET DE LA CHARGE DE Ca^{2+} DU RS ...	93
A.	<i>Principe</i>	93
B.	<i>Sonde Fura-2 AM</i>	93
C.	<i>Solutions</i>	94
D.	<i>Installation</i>	95
E.	<i>Mesure des transitoires Ca^{2+}, du raccourcissement cellulaire, de la charge et de la fuite de Ca^{2+} du RS</i>	97
F.	<i>Traitement des données</i>	99
G.	<i>Analyse</i>	100
IV.	ENREGISTREMENT DE POTENTIELS D'ACTION	102
A.	<i>Principe</i>	102
B.	<i>Solutions</i>	103
C.	<i>Dispositif expérimental et chaîne d'acquisition</i>	103
D.	<i>Mesures, protocole</i>	105
E.	<i>Analyse</i>	106
V.	TECHNIQUES D'IMAGERIE - FRET	106
A.	<i>Principe</i>	106
B.	<i>Installation de FRET</i>	107
C.	<i>Sondes FRET</i>	108
1.	Sonde AKAR3-NES	108
2.	Sonde H187	109
D.	<i>Analyse des données</i>	110

VI.	METHODES BIOCHIMIQUES.....	111
A.	<i>Stimulation des cardiomyocytes</i>	111
B.	<i>Extraction des protéines totales à partir des cardiomyocytes</i>	111
C.	<i>Dosage des protéines</i>	111
D.	<i>Western Blot</i>	112
1.	Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	112
2.	Transfert des protéines sur membrane	113
3.	Immunomarquage et révélation	113
4.	Analyse et quantification.....	114
5.	Anticorps	114
VII.	SOLUTIONS.....	116
VIII.	ANALYSES STATISTIQUES	117
	RESULTATS.....	119
I.	REGULATION DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION CARDIAQUE PAR LES PHOSPHODIESTERASES DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES	119
A.	<i>Introduction</i>	119
B.	<i>Résultats</i>	120
C.	<i>Conclusions</i>	139
II.	CARACTERISATION DES ARYTHMIES INDUITES PAR L'INHIBITION DES PDE4	140
A.	<i>Introduction</i>	140
B.	<i>Résultats</i>	140
C.	<i>Conclusions</i>	141
III.	ROLE DES PDE3 ET DES PDE4 DANS LA REGULATION DE L'HOMEOSTASIE Ca^{2+} ET LA PREVENTION DES ARYTHMIES CHEZ LE RONGEUR	142
A.	<i>Introduction</i>	142
B.	<i>Résultats</i>	143
C.	<i>Conclusions</i>	177
IV.	ROLE DES PDE3 ET DES PDE4 DANS LA PREVENTION DES ARYTHMIES CHEZ LE COCHON, IMPLICATION DE LA CAMKII ...	179
A.	<i>Introduction</i>	179
B.	<i>Résultats</i>	180
C.	<i>Conclusions</i>	182
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	183
	BIBLIOGRAPHIE	187

RESUME

Résumé

La voie β -adrénergique (β -AR)/AMPc est cruciale pour l'adaptation de la fonction cardiaque. Dans l'insuffisance cardiaque (IC), cette signalisation est perturbée et une part importante des patients meurt de troubles du rythme. Classiquement, les effets inotrope et lusitrope positifs de l'AMPc sont attribués à la phosphorylation par la protéine kinase AMPc dépendante (PKA) des protéines clés du couplage excitation-contraction (CEC). L'AMPc active aussi le facteur d'échange Epac, impliqué dans l'hypertrophie cardiaque et le contrôle de l'homéostasie calcique. Une cible d'Epac est la CaMKII, une kinase modulée par le Ca^{2+} et la calmoduline qui phosphoryle aussi les protéines clés du CEC, et dont l'activation est pro-arythmique.

Les phosphodiésterases (PDEs) de type 3 et 4 sont majeures pour dégrader l'AMPc et contrôler l'homéostasie calcique et le CEC. Les inhibiteurs de PDE3 sont de puissants cardiotoniques mais leur utilisation est limitée par leurs effets pro-arythmiques. De plus, l'inactivation de gènes codant pour PDE4 conduit à des arythmies ventriculaires. Mon travail a permis d'identifier les perturbations de l'homéostasie calcique responsables de la survenue d'arythmies lorsque l'activité des PDE3 et des PDE4 est diminuée. Mes résultats montrent que les inhibiteurs de PDEs exercent des effets inotropes via PKA, mais suscitent des vagues de Ca^{2+} pro-arythmiques impliquant la PKA et la CaMKII activée en partie via Epac. Ceci suggère l'utilisation potentielle d'inhibiteurs de CaMKII comme compléments aux inhibiteurs de PDEs pour limiter leurs effets délétères, une hypothèse que j'ai pu vérifier dans un modèle porcin plus proche du patient.

Mots Clés : arythmies, récepteurs β -adrénergiques, AMPc, phosphodiésterases

Abstract

The β -adrenergic pathway (β -AR)/cAMP is crucial for the adaptation of the cardiac function upon stress. In heart failure (HF), this signaling pathway is disrupted and a significant proportion of patients dies of cardiac arrhythmias. Classically, the inotropic and lusitropic effects of cAMP are attributed to the phosphorylation by the cAMP-dependent protein kinase (PKA) of the key proteins of the excitation-contraction coupling (ECC). cAMP also activates the exchange factor Epac, which is involved in cardiac hypertrophy and controls intracellular Ca^{2+} homeostasis. Epac activates CaMKII, another kinase modulated by Ca^{2+} and calmodulin which phosphorylates the same key proteins of the ECC, and is involved in arrhythmogenesis.

Phosphodiesterases (PDEs) type 3 and 4 are crucial enzyme to degrade cAMP and to control Ca^{2+} homeostasis, thus ECC. PDE3 inhibitors are potent cardiotonic drugs but their use is limited by their pro-arrhythmic effects. Furthermore, the invalidation of genes encoding PDE4 results in ventricular arrhythmias. My work allowed characterizing the perturbations of Ca^{2+} homeostasis which lead to arrhythmias when PDE3 and PDE4 activities are decreased. My results show that PDE inhibitors exert inotropic effects via PKA, but evoke pro-arrhythmic Ca^{2+} waves via both PKA and CaMKII, the latter being activated in part *via* Epac. Altogether, these results suggest the potential use of CaMKII inhibitors as adjuncts to PDEs inhibitors to limit their deleterious effects, a hypothesis I also tested in a porcine model closer to the patient.

Key words : arrhythmias, β -adrenergic receptors, cAMP, phosphodiesterases

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

ABC : Transporteurs cellulaires (*ATP-binding cassette*)
AC : Adénylate cyclase
ADP : Adénosine diphosphate
AKAP : Protéine d'ancrage de la PKA (*A-kinase anchoring proteins*)
AMP : Adénosine monophosphate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
Arg : Arginine
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BTZ : Benzothiazépines
Ca²⁺ : Calcium
CaM : Calmoduline
CaMKII : Protéine kinase de type II dépendante du complexe Ca²⁺/CaM
CaN : Calcineurine (PP2B)
Ca_v1.2 : Canal Ca²⁺ dépendant du potentiel portant la sous-unité α_{1C}
Ca_v1.3 : Canal Ca²⁺ dépendant du potentiel portant la sous-unité α_{1D}
CEC : Couplage excitation-contraction
CET : couplage excitation-transcription
CICR : Relargage de Ca²⁺ induit par le Ca²⁺ (*Ca²⁺-induced-Ca²⁺-release*)
CNB : Domaine de liaison aux nucléotides cycliques (*cyclic nucleotide binding domain*)
CO₂ : Dioxyde de carbone
CPVT : Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique
CRE : Elément de réponse de l'AMPc (*cAMP responsive element*)
CREB : (*cAMP responsive element binding protein*)
CREM : (*cAMP responsive element binding modulator*)
CSQ : Calséquestrine
Cys : Cystéine
D/D : Domaine de dimérisation de la PKA (*Dimerization/Docking Domain*)
DAD : Post-dépolarisation tardive (*delayed after-depolarization*)
DAG : Diacylglycérol
DEP : Domaine d'adressage intracellulaire (*Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin*)
DHP : Dihydropyridine
DHPR : Récepteur aux dihydropyridines
E_{act} : Potentiel d'activation du canal ionique
EC₅₀ : Concentration efficace médiane
E_m : Potentiel de membrane
Epac : Facteur d'échange des petites protéines G (*exchange protein directly activated by cAMP*)
ERK5 : (*extracellular signal-regulated kinase 5*)
FKBP 12.6 : Calstabin 2
GAF : Domaine *cGMP*, *Adenylyl cyclase Fh1A*
GDP : Guanosine diphosphate
G_i : Protéine G inhibitrice des AC
Glu : Glutamate
Gly : Glycine

GMPC : Guanosine monophosphate cyclique
G_q : Protéine G stimulatrice de la PLC
GRK : Protéine kinase des récepteurs couplés aux protéines G (*G-protein coupled receptor kinase*)
G_s : Protéine G stimulatrice des AC
GTP : Guanosine triphosphate
HCN : Canal ionique dépendant des nucléotides cycliques et activé par l'hyperpolarisation (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*)
HCN : Canaux des nucléotides cycliques activés par l'hyperpolarisation (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*)
HCO₃⁻ : Bicarbonate
HDAC : Histone déacétylase
HVA : Canaux Ca²⁺ activés à haut seuil (*high-voltage-activated*)
IBMX : inhibiteur non-sélectif des PDE (3-isobutyl-1-méthylxanthine)
IC : Insuffisance cardiaque
I_{Ca,L} : Courant calcium de type L
ICER : facteur de répression transcriptionnelle pro-apoptotique (*inducible cAMP early repressor*)
I_f : Courant pacemaker des cellules nodales activé par l'hyperpolarisation (*funny current*)
I_{K1} : Courant potassium de fond
I_{Kr} : Courant potassium de fond (*rapid K⁺ current*)
I_{Ks} : Courant potassium de fond (*slow K⁺ current*)
IP₃ : Inositol triphosphate
IP₃R : Récepteur de l'IP₃
IS : Séquence inhibitrice de la PKA (*Inhibitor Sequence*)
I_{to} : Courant potassium sortant transitoire
I_{ti} : Courant électrogénique de Na⁺ porté par le NCX
K⁺ : Potassium
KCNQ1/KCNE1 : Canaux K⁺ responsables du courant I_{Ks}
KI : *Knock-in*
K_{ir} : Courant potassium rectifiant entrant
KO : *Knock-out*
LTCC : Canal calcique de type L
Lys : Lysine
Main EF : Motif de fixation du Ca²⁺ composé de deux hélices (E et F) reliées entre elles par une séquence d'une dizaine d'acides aminés (*EF hand*)
mAKAP : AKAP musculaire
MAPK : Protéine kinase activée par les facteurs mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*)
MEF2 : Facteur pro-hypertrophique (*myocyte enhancer factor 2*)
MHC : Chaînes lourdes de myosine (*myosin heavy chain*)
MLC : Chaînes lourdes de myosine (*myosin light chain*)
Motif IQ : Séquence peptidique avec en premières positions une isoleucine (Ile ou I, principalement) et une glutamine (Gln ou Q, exclusivement)
MRP : Protéines d'efflux de l'AMPc (*multidrug resistance-associated proteins*)
MyBP-C : Protéine C de liaison à la myosine (*myosin binding protein-C*)
Na⁺ : Sodium
NCX : Echangeur Na⁺/Ca²⁺
NFAT : Facteur de transcription nucléaire des lymphocytes T (*nuclear factor of activated T-cells*)

NHR : Domaine hydrophobe d'association membranaire (*N-terminal hydrophobic region*)
NO : Monoxyde d'azote
PA : Potentiel d'action
PAA : Phénylalkylamines
PBC : Domaine de liaison de l'AMPc sur la PKA (*Phospho-Binding Cassette*)
PDE : Phosphodiesterase
PF-04957325 : Inhibiteur sélectif des PDE8
P_i : Phosphate inorganique
P_i : Phosphate inorganique
PI3K : Protéine kinase de phosphoinositide-3 (*phosphatidyl-inositol-3-kinase*)
PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC : Protéine kinase dépendante du Ca²⁺
PKG : Protéine kinase dépendante du GMPc
PKI : Peptide inhibiteur de la PKA (*protein kinase inhibitor*)
PLA2 : Phospholipase A2
PLB : Phospholamban
Plb^{-/-} : Animaux déficients en PLB
PLC : Phospholipase C
PMCA : Ca²⁺-ATPase du sarcolemme (*plasma membrane Ca²⁺-ATPase*)
PP1 : Protéine phosphatase de type 1
PP2A : Protéine phosphatase de type 2A
PP2B : Protéine phosphatase de type 2B (CaN)
PPI : Inhibiteur de phosphatase
PPi : Pyrophosphate inorganique
PRKX : *Human X chromosome-encoded protein kinase X*
RA : Domaine d'association d'Epac avec Ras (*Ras association domain*)
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
REM : Domaine stabilisateur d'Epac (*Ras exchange motif*)
RGS : Régulateur des protéines G (*regulator of G-protein signaling*)
ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive oxygen species*)
Rp-cAMP : Analogue de l'AMPc antagoniste de la PKA
RS : Réticulum sarcoplasmique
RyR2 : Récepteur de la ryanodine, isoforme cardiaque
SCWs : Vagues calciques spontanées (*spontaneous Ca²⁺ waves*)
Ser : Sérine
SERCA2a : Pompe Ca²⁺ du RS (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*)
Thr : Thréonine
Tn : Troponine
TnC : Troponine se liant au Ca²⁺
TnI : Troponine inhibitrice
TnT : Troponine se liant à la tropomyosine
TTCC : Canal Ca²⁺ de type T
Tubule T : Tubule transverse
UCR : Régions conservées (*upstream conserved region*)
UP : Uniporteur mitochondrial
Val : Valine
VOC : Canal Ca²⁺ activé par la dépolarisation (*Voltage-operated channel*)
β-AR : β-adrénérique

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Le couplage excitation-contraction (CEC) cardiaque

Le système cardio-vasculaire permet d'assurer la perfusion sanguine de l'ensemble de l'organisme, assurant ainsi son approvisionnement en métabolites énergétiques, en oxygène, et permettant l'évacuation des déchets issus du métabolisme tels le CO_2 . Le cœur en est l'organe central. Il fonctionne comme une pompe dont les contractions sont déclenchées, en conditions physiologiques, de manière régulière, assurant ainsi une perfusion continue des organes grâce à la propriété d'élastance du système artériel. Ces contractions rythmiques trouvent leur origine au sein du cœur lui-même, et plus précisément au niveau de l'oreillette droite. A cet endroit du cœur, des cellules spécialisées ont la particularité de ne pas présenter de potentiel de repos mais au contraire une dépolarisation diastolique lente qui aboutit au déclenchement régulier d'impulsions électriques appelées potentiels d'action (PA). Ce regroupement de cellules présentant une dépolarisation automatique est appelé nœud sinusal, il constitue le pacemaker cardiaque. Les PA ainsi générés vont se propager dans l'ensemble du tissu auriculaire, atteindre le nœud auriculo-ventriculaire pour se propager le long des fibres de conduction (faisceau de His et fibres de Purkinje) jusque dans les ventricules (**Figure 1**). Cette propagation de l'influx électrique est possible car le tissu cardiaque forme un syncytium électrique, lié à l'existence de canaux jonctionnels formés de connexines cardiaques.

L'expression des différents canaux ioniques variant d'une région à l'autre du cœur (et également d'une espèce à l'autre), il en résulte divers types de PA cardiaques dont la morphologie varie selon les courants ioniques mis en jeu (Figure 1). Dans le myocarde travaillant (par opposition au tissu nodal automatique), le couplage excitation-contraction (CEC) cardiaque correspond à l'ensemble des processus permettant la transformation du signal électrique constitué par le PA, en une réponse mécanique qui va permettre à l'organe de remplir sa fonction de pompe : la contraction de la cellule musculaire cardiaque ou cardiomyocyte. La propagation de l'influx électrique des oreillettes vers les ventricules va ainsi entraîner une contraction périodique de ces deux ensembles ce qui permet une circulation sanguine efficace au niveau cardiaque. Les mécanismes à l'origine des cycles de contraction-relaxation peuvent être divisés en trois phases principales : l'excitation qui va consister en un déclenchement du CEC par le PA, la contraction qui constitue le travail

mécanique du myocarde (systole), et la relaxation qui assure un retour du myocarde à l'état de repos (diastole).

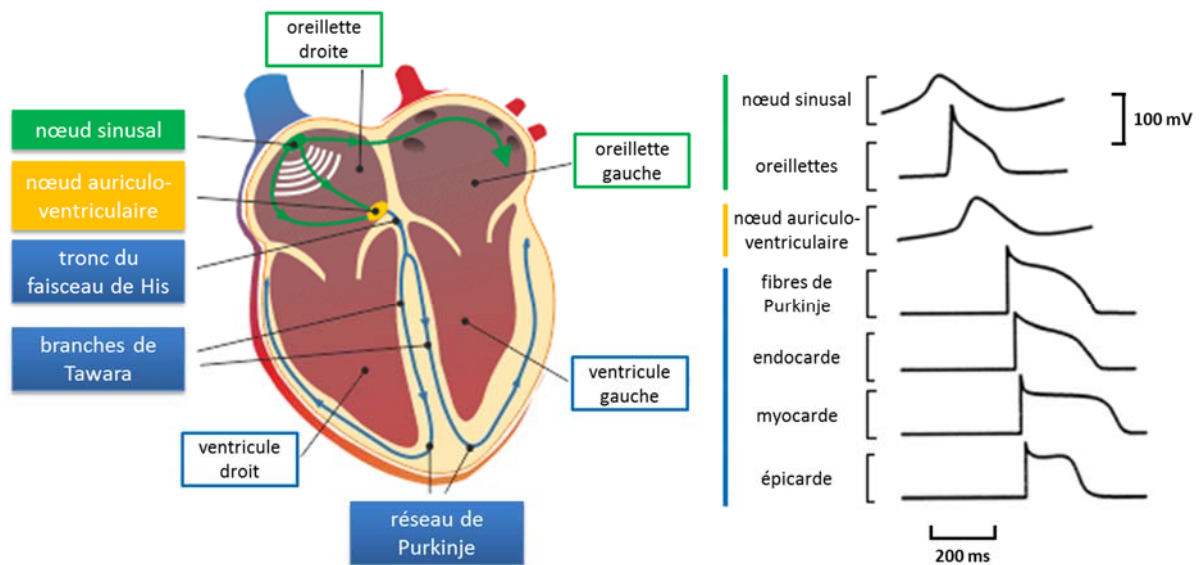


Figure 1 : Faisceaux de conduction de l'influx électrique cardiaque et potentiels d'action

Le courant électrique naît au niveau du nœud sinusal, l'onde dépolarisante se propage à l'ensemble du tissu auriculaire ce qui permet la contraction simultanée des deux oreillettes. L'onde de dépolarisation atteint ensuite le nœud auriculo-ventriculaire, d'où elle gagne le tissu conducteur *via* le tronc du faisceau de His, les branches de Tawara et le réseau de Purkinje qui permet une propagation de l'onde de dépolarisation à l'ensemble du tissu ventriculaire ce qui provoque la contraction des ventricles, et l'éjection du sang vers les artères pulmonaire et aortique. (modifié d'après www.fedecardio.org et Bers, 2001, dans : Excitation Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2nd Ed., Kluwer Academic Publishers)

A. Le potentiel d'action (PA) : déclencheur du CEC

La description du paragraphe suivant correspond à celle du PA ventriculaire. Le potentiel de membrane est la résultante de la somme des différences de potentiel de chaque ion qui dépendent de leurs concentrations respectives de part et d'autre du condensateur que constitue le sarcolemme. A l'état de repos, c'est-à-dire en diastole, l'équilibre des différents ions de part et d'autre de la membrane est dû à l'activité de transporteurs actifs tels que la pompe Na^+/K^+ (Na^+/K^+ -ATPase), l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) ou la Ca^{2+} -ATPase permettant de maintenir un milieu intracellulaire riche en K^+ et faiblement concentré en sodium (Na^+) et calcium (Ca^{2+}). Ainsi, en diastole, la membrane est perméable presque exclusivement au K^+ grâce à la présence de canaux K^+ indépendant du voltage ($\text{K}_{ir2.1}$ et 2.2) portant le courant de fond I_{K1} ; le potentiel de membrane (E_m) des cardiomyocytes ventriculaires est donc proche du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ avec $E_m \approx -80 \text{ mV}$.

Lors de la stimulation du myocyte par la propagation passive d'un courant électrique à partir d'une région voisine, le potentiel de membrane atteint le seuil d'activation des canaux Na^+ voltage-dépendants ($E_{\text{act}} \approx -70 \text{ mV}$) ce qui entraîne leur ouverture massive et un brusque influx de Na^+ dans le cytoplasme (Nerbonne et Kass 2005 ; Catterall et Swanson 2015). Cette entrée massive de cations crée une rapide dépolarisation membranaire (phase 0 du PA), le potentiel de membrane étant déplacé vers le potentiel d'équilibre de l'ion Na^+ . Cette dépolarisation entraîne la rectification entrante du courant I_{K1} , permettant de limiter la sortie de K^+ pendant la durée du PA. C'est à ce moment que la membrane atteint sa dépolarisation maximale, appelée *overshoot*, et qui est comprise entre +35 et +50 mV (Bers 2001). Le courant I_{Na} s'inactive rapidement, cette phase étant suivie d'une période réfractaire permettant la conduction unidirectionnelle du courant électrique. Le sarcolemme se repolarise alors transitoirement principalement sous l'effet du courant I_{to} permettant d'atteindre des potentiels pour lesquels les courants Ca^{2+} peuvent s'activer (Deck et Trautwein 1964). Le PA présente alors une phase de plateau calcique (phase 2 du PA) caractérisée par une relative compensation des courants sortants potassiques (I_{K_r} et I_{K_s}) par les courants entrants (majoritairement $I_{\text{Ca,L}}$ via le canal Ca^{2+} de type L) (Reuter 1967). Il faut noter que chez le rat ou la souris, cette phase de plateau est quasiment absente du fait de l'importance de la repolarisation précoce. Le retour au potentiel de repos est ensuite assuré par une sortie d'ions K^+ principalement par les courants I_{K_r} et I_{K_s} (Charpentier et al. 2010).

Au niveau des myocytes ventriculaires, le PA se propage le long du sarcolemme jusque dans des invaginations membranaires appelées tubules transverses ou tubules T (pour revues : Ferrantini et al. 2013 ; Kline et Mohler 2013). Les tubules T, par leur répartition en un réseau organisé, continu et ramifié, permettent la propagation du PA jusqu'au cœur de la cellule, au plus près des effecteurs intracellulaires du CEC. Les tubules T jouent également un rôle dans l'organisation des protéines intervenant dans le CEC. En effet, les tubules T sont enrichis en protéines jouant un rôle clé dans le CEC tels que les canaux Ca^{2+} de type L dépendants du potentiel (LTCC) : si les tubules T représentent 3,6% du volume cellulaire (Soeller et Cannell 1999) et environ 20% de la membrane plasmique dans le myocyte ventriculaire de rat (Kemi et al. 2011) (entre 30% et 50% chez les autres mammifères), ils concentrent 75% des canaux Ca^{2+} cellulaires (Kawai et al. 1999). C'est d'ailleurs l'activation des LTCC par le PA qui va activer le mécanisme aboutissant à la contraction cellulaire : le CEC.

B. Le rôle central du Ca^{2+} dans le CEC

Le Ca^{2+} est connu pour être impliqué dans de nombreux phénomènes à l'échelle cellulaire tels que la transcription de gènes, la mort cellulaire, mais aussi la contraction cellulaire (Roderick et al. 2003). Ceci est notamment le cas au niveau cardiaque (**Figure 2**).

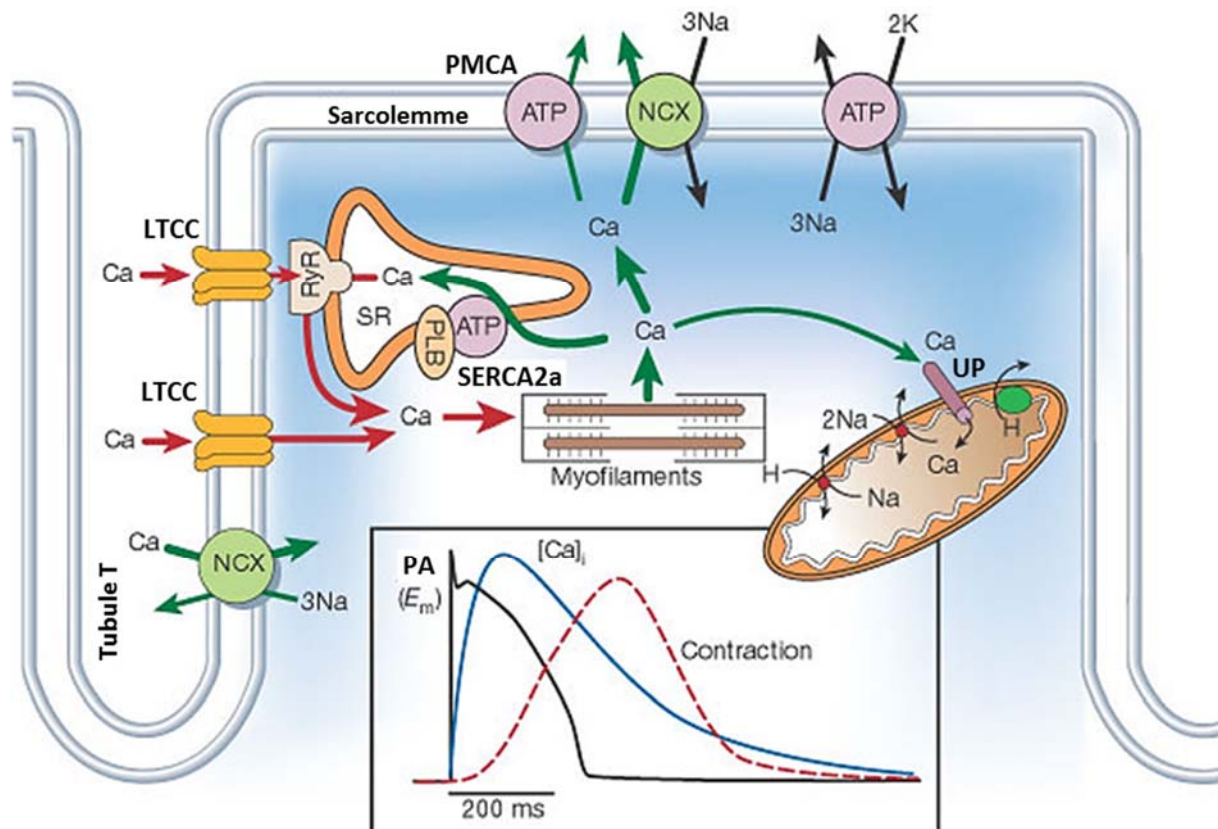


Figure 2 : Couplage excitation-contraction dans un myocyte ventriculaire

Lors du potentiel d'action cardiaque (PA), l'ouverture des canaux calciques de type L (LTCC) permet un influx de Ca^{2+} qui provoque la vidange du réticulum sarcoplasmique (RS) par l'ouverture des récepteurs de la ryanodine (RyR2). L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire active les myofilaments et le cardiomyocyte se contracte. Lors de la relaxation, le Ca^{2+} est recapté dans le RS par les pompes SERCA2a dépendantes de l'ATP, extrudé de la cellule par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) et l'ATPase de la membrane plasmique, ou capté par l'uniporteur mitochondrial (UP). Le graphique dans la partie inférieure de la figure représente la superposition d'un PA, de la transitoire Ca^{2+} associée et de la contraction qui en découle en fonction du temps. (adapté de Bers 2002)

Dans un cardiomyocyte au repos, la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique est d'environ 100 nM. La majorité du Ca^{2+} intracellulaire est alors stockée au sein du réticulum sarcoplasmique (RS) qui constitue la principale réserve de Ca^{2+} avec une concentration comprise entre 100 μM et 1 mM. Les LTCC ouverts lors du PA laissent entrer du Ca^{2+} dans

la cellule. Or l'ouverture de ces canaux ne suffit pas à entraîner une augmentation suffisante de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique permettant l'activation des protéines contractiles. Cette entrée de Ca^{2+} extracellulaire va cependant servir à déclencher un relargage massif des réserves de Ca^{2+} intracellulaire contenues dans le RS qui va alors permettre la contraction de la cellule. Le Ca^{2+} joue donc un rôle central dans le CEC puisqu'il est responsable à la fois du déclenchement de la libération des réserves de Ca^{2+} intracellulaires, on parle de phénomène de relargage de Ca^{2+} induit par le Ca^{2+} (CICR pour : *Ca²⁺-induced-Ca²⁺-release*) (Fabiato et Fabiato 1978), et de l'activation des protéines contractiles en interagissant avec les protéines régulatrices des protéines contractiles (**Figure 2**).

1. Principe du CICR

La contraction des cellules musculaires cardiaques nécessite l'activation des protéines contractiles par la fixation d'ions Ca^{2+} sur les protéines régulatrices associées aux filaments d'actine. Le PA, à l'origine de la stimulation des myocytes, se propage à la surface membranaire jusque dans les tubules T où il active les LTCC permettant une entrée de Ca^{2+} . Or, si la contraction cardiaque est dépendante à court terme du Ca^{2+} extracellulaire Ringer 1883, cette entrée de Ca^{2+} *via* les LTCC n'est pas suffisante (Fabiato et Fabiato 1977), du fait de l'inactivation de ces canaux, pour déclencher une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le cytoplasme permettant la contraction cellulaire. Cependant, grâce à la proximité entre les LTCC des tubules T et les canaux Ca^{2+} situés à la membrane du RS, l'influx de Ca^{2+} *via* les LTCC (augmentation de la concentration de Ca^{2+} au sein de la diade pour atteindre 1 μM sur une distance de 50 nm en moins de 500 μs) permet de déclencher une libération des réserves de Ca^{2+} intracellulaires entraînant une forte augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique (vraisemblablement supérieure à 50 μM au niveau de la diade) nécessaire à l'activation des protéines contractiles (Langer et Peskoff 1996 ; pour revue : Bers 2002).

2. Induction du CICR par le LTCC

Les canaux Ca^{2+} forment des pores permettant le passage rapide et sélectifs d'ions Ca^{2+} au travers de la membrane plasmique. Le flux d'ions au travers de ces canaux, qui est fonction du gradient électrochimique, crée un courant Ca^{2+} . Dans la mesure où les ions Ca^{2+}

sont plus concentrés à l'extérieur de la cellule ($\approx 1,8 \text{ mM}$), l'ouverture des canaux Ca^{2+} conduit à un influx d'ions Ca^{2+} dans la cellule ; cet influx participant à la dépolarisation de celle-ci.

Le canal calcique de type L fait partie de la famille des canaux Ca^{2+} activés par la dépolarisation (ou VOC pour *Voltage-operated channel*). Le LTCC se caractérise par sa sensibilité aux dihydropyridines (DHP) (Nilius et al. 1985) c'est pourquoi il est aussi appelé récepteur aux dihydropyridines (DHPR). Les canaux Ca^{2+} activés par la dépolarisation membranaire s'organisent en trois sous-familles : les canaux de type T, les canaux de type L, et la famille des canaux de type P/Q, N et R (Varadi et al. 1999). Dans les myocytes cardiaques, on retrouve des canaux Ca^{2+} de type T (sous-unités α_{1G} et α_{1H}) et des canaux de type L (formés en majorités par des canaux comprenant des sous-unités α_{1C} caractéristiques des canaux $\text{Cav}1.2$) ; les formes N, Q et R n'étant présentes au niveau du cœur que dans les neurones intracardiaques (Jeong et Wurster 1997). Les quantités de canaux Ca^{2+} de type T (TTCC) au niveau ventriculaire varient selon les espèces mais aussi selon le stade de développement de l'organisme. Si les TTCC n'ont pas été détectés dans le ventricule de chat (Nuss et Houser 1993), de furet (Yuan et Bers 1994), ainsi que de lapin et de rat adulte (Yuan et al. 1996), il a cependant été montré que les TTCC sont faiblement exprimés dans le ventricule de cochon d'inde (Mitra et Morad 1986) et plus fortement dans le ventricule de rat néonatal (Gaughan et al. 1998) mais aussi dans des myocytes de cœurs adultes hypertrophiés de chat (Nuss et Houser 1993) et de rat (Martinez et al. 1999). Le TTCC est donc plutôt exprimé au niveau nodal et atrial, en accord avec un rôle dans l'automatisme cardiaque (Hagiwara et al. 1988). Le LTCC regroupe les $\text{Cav}1.2$ (ubiquitaires) et les $\text{Cav}1.3$ (exprimés au niveau du tissu nodal) (Ertel et al. 2000 ; Mangoni et al. 2003).

Les LTCC sont principalement situés au niveau des tubules T. Le canal Ca^{2+} de type L $\text{Cav}1.2$ est le LTCC majoritaire au niveau ventriculaire. Comme les autres canaux Ca^{2+} activés à haut seuil (canaux HVA pour *high-voltage-activated*), il présente une organisation hétéromultimérique. Le LTCC est composé d'une sous-unité α_{1C} , qui porte le pore du canal ionique, et de sous-unités auxiliaires régulatrices qui modulent l'activité canalaire : les sous-unités β et $\alpha_2\delta$ (il existe également des sous-unités γ mais qui ne sont présentes que dans le muscle squelettique et les neurones) (Shaw et Colecraft 2013) (**Figure 3**).

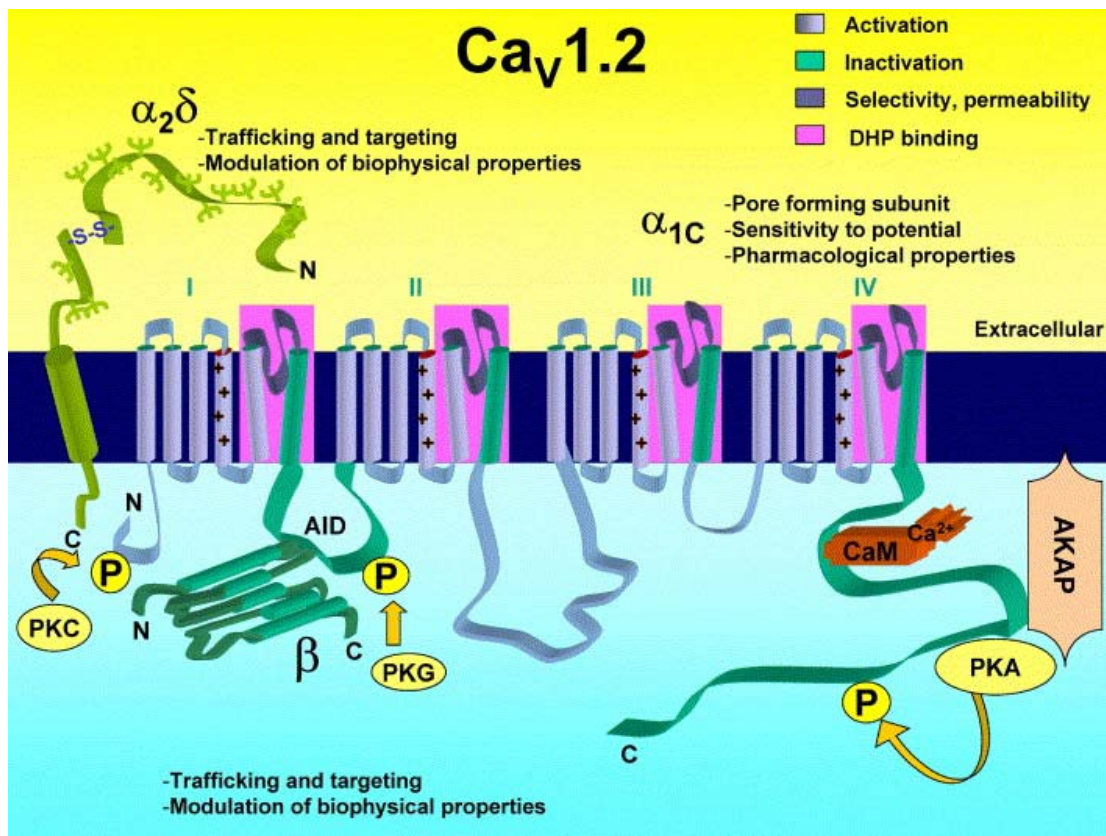


Figure 3 : Représentation schématique du canal calcique de type L (LTCC)

La sous-unité Ca_v1.2 (α_{1C}) ainsi que les sous-unités accessoires (β et $\alpha_{2\delta}$) sont représentées. La sous-unité Ca_v1.2 est composée de quatre domaines transmembranaires, contenant chacun six segments (S1-S6). Les segments S4, riches en résidus chargés positivement, sont les détecteurs de voltage du canal. Les segments en violet sont responsables de l'activation du canal et le segment S6 (vert) de son inactivation. Les domaines en rose sont les sites de liaison aux dihydropyridines (DHP). L'interaction entre Ca_v1.2 et β a lieu au niveau du domaine AID (*A Interacting Domain*). Le canal présente différents niveaux de régulation : par le complexe Ca²⁺/calmoduline (Ca²⁺/CaM), par phosphorylation par les kinases PKA, PKC, PKG et CaMKII, par glycosylation de la sous-unité $\alpha_{2\delta}$. (D'après Brette et al. 2006).

La sous-unité α_{1C} , protéine de 190 kDa formant le pore du canal, a été séquencée et clonée en 1989 à partir du cœur de lapin (Mikami et al. 1989). Elle est constituée de quatre domaines transmembranaires (numérotés de I à IV) eux-mêmes constitués de six segments transmembranaires (numérotés de S1 à S6) organisés en hélice α et dont le segment S4 porte un surcroît de résidus Arg et Lys chargés positivement qui lui confère sa dépendance au potentiel (Catterall 2000). L'activation et l'inactivation du LTCC dépendent des segments S3 et S6 du domaine I. Le LTCC s'active pour des potentiels supérieurs à -40 mV et admet un courant maximal pour des potentiels d'environ 0 mV. Le canal possède deux sites de fixation pour le Ca²⁺ faisant intervenir quatre résidus Glu (Yang et al. 1993 ; Ellinor et al. 1995). Le premier site, de haute affinité pour le Ca²⁺, voit son activité diminuée lors de la fixation d'un deuxième ion Ca²⁺ sur le second site de fixation du pore, permettant ainsi aux ions de se

détacher de la lumière du canal et d'être libérés dans le cytoplasme (Jones 1998). Ce canal admet une inactivation biphasique avec une phase rapide dépendante du Ca^{2+} et une seconde phase lente dépendante du potentiel de membrane (Argibay et al. 1988 ; pour revue : Benitah et al. 2010). La phase rapide, qui sert de rétrocontrôle négatif sur l'activation du canal, est majoritairement dépendante du Ca^{2+} libéré par le RS, mais également du Ca^{2+} entrant dans cet espace sous-membranaire par le LTCC lui-même (Richard et al. 2006). Ce rétrocontrôle est médié par la fixation d'ions Ca^{2+} sur la calmoduline (CaM) (Zuhlke et al. 1999), une protéine dotée de motifs en main EF (*EF hand*) lui permettant de fixer quatre ions Ca^{2+} . Le complexe Ca^{2+} -CaM va être recruté au niveau d'une séquence peptidique spéciale contenant environ vingt-trois acide-aminés avec en premières positions une isoleucine (Ile ou I, principalement) et une glutamine (Gln ou Q, exclusivement) appelée motif IQ et située à l'extrémité C-terminale du canal LTCC (Zuhlke et Reuter 1998 ; Peterson et al. 1999) comprenant elle-aussi un motif en main EF de senseur de Ca^{2+} , ceci entraînant un changement de conformation de l'extrémité C-terminale de la protéine Cav1.2 conduisant à son inactivation (Halling et al. 2006).

L'interaction de la CaM avec la sous-unité α_{1C} semble également intervenir dans un autre mécanisme de régulation de l'activité du canal : la facilitation (ou *staircase* positif). Elle se caractérise par une augmentation de l'amplitude du courant Ca^{2+} et de la constante de temps d'inactivation lors d'une augmentation de la fréquence de stimulation ou lors d'une augmentation du potentiel de stimulation vers des potentiels très élevés (supérieurs à +100 mV) (Argibay et al. 1988). Si dans un premier temps certaines études ont relié la facilitation avec la protéine kinase dépendante de l'AMPc (protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique, PKA) (Tiaho et al. 1994) et l'AMPc (Piot et al. 1996), la littérature plus récente nous présente plutôt un phénomène de *staircase* positif dépendant du Ca^{2+} résultant plus précisément de la phosphorylation par la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CaMKII), qui est activée par le complexe Ca^{2+} /CaM, du canal (Anderson et al. 1994 ; Xiao et al. 1994). Il a été suggéré dans les myocytes ventriculaires de rat que la facilitation participe à l'augmentation de la durée du PA en réponse à une augmentation de la fréquence de stimulation (Fauconnier et al. 2003). La phosphorylation du canal ou de la sous-unité β_{2a} a pour conséquence une augmentation de l'amplitude du courant $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ et une diminution de la cinétique de son inactivation (Bers et Morotti 2014).

L'activité des LTCC peut être inhibée pharmacologiquement par trois classes de molécules qui se fixent sur la sous-unité α_1 : les dihydropyridines (DHP), les

benzothiazépines (BTZ) et les phénylalkylamines (PAA). Les DHP et les BTZ se fixent sur les segments S6 des domaines III et IV, avec une troisième site de fixation supplémentaire sur le segment S5 du domaine III pour les DHP (Striessnig et al. 1991 ; Kurokawa et al. 1997). Les PPA sont des bloqueurs du pore qui agissent du côté intracellulaire du canal avec une fixation au niveau des segments S6 des domaines III et IV (Striessnig et al. 1990). Les BTZ et les PAA se fixent sur la sous-unité α_1 par voie hydrophile, ces molécules nécessitent donc une ouverture préalable du LTCC pour le bloquer contrairement aux DHP qui se fixent sur la sous-unité α_{1C} par voie hydrophobe. Le transport de Ca^{2+} par les LTCC peut également être bloqué par l'utilisation d'inhibiteurs inorganiques tels que le lanthane (La^{3+}), le cadmium (Cd^{2+}), le nickel (Ni^{2+}), le cobalt (Co^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}), ou le magnésium (Mg^{2+}) qui vont entrer en compétition avec les ions Ca^{2+} sur les sites de fixation présents à l'intérieur du pore (Jones 1998).

La sous-unité β_2 formant le LTCC est cytosolique et représente la sous-unité β majoritaire au niveau cardiaque (Hullin et al. 1992). Parmi les trois transcrits recensés (β_{2a} , β_{2b} , β_{2c}), la sous-unité β_{2a} est la plus étudiée car il a été montré qu'elle s'associe avec le LTCC au niveau de la membrane (Chien et al. 1998). Cette sous-unité de 60 kDa interagit avec la sous-unité α_{1C} grâce à des domaines d'interaction AID (pour *α interaction domain*) et BID (*β interaction domain*) respectivement présents sur les sous-unités α_{1C} et β_{2a} (Buraei et Yang 2010). Cette interaction est impliquée dans l'augmentation de l'amplitude du courant ionique et permet une modulation des cinétiques et de la sensibilité au potentiel du canal (De Waard et al. 1996). La sous-unité β_{2a} constitue également le substrat de kinases telles que la PKA ou la CaMKII.

La sous-unité $\alpha_2\delta$ est codée par un seul gène mais le transcrit est ensuite traduit en une protéine qui est clivée par une enzyme inconnue en une partie α_2 de 143 kDa et une partie δ de 27 kDa. Ces deux domaines restent cependant interconnectées après ce clivage protéolytique par des ponts disulfure (Jay et al. 1991). On dénombre à ce jour trois isoformes nommées $\alpha_2\delta_{1-3}$ (Klugbauer et al. 1999), dont deux sont exprimées au niveau cardiaque : $\alpha_2\delta_1$ et $\alpha_2\delta_2$ (Marais et al. 2001). L'isoforme $\alpha_2\delta_1$ constitue l'isoforme cardiaque majoritaire (Fuller-Bicer et al. 2009). Ce complexe $\alpha_2\delta$ est impliqué dans l'adressage du canal à la surface membranaire et permet également une augmentation des cinétiques d'activation et d'inactivation, de la probabilité d'ouverture du canal ainsi que de la conductance ionique maximale (Bangalore et al. 1996) dépendant des résidus Arg 941 et Val 946 (Andrade et al. 2007).

Outre la régulation par la fréquence, le potentiel, et les sous-unités auxiliaires régulatrices, le LTCC est régulé par différentes protéines kinases (la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), la protéine kinase de type II dépendante du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (CaMKII), la protéine kinase dépendante du Ca^{2+} (PKC), la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG). Ces kinases appartiennent à diverses voies de signalisation intracellulaires et peuvent phosphoryler soit la sous-unité α_{1C} directement soit la sous-unité régulatrice β_{2a} (Hofmann et al. 2014). Les régulations faisant intervenir la PKA et la CaMKII seront décrites dans les chapitres correspondants à ces deux protéines kinases.

L'activation de la PKC est l'étape ultime dans les voies de signalisation liées à la stimulation de récepteurs couplés aux protéines de type Gq (récepteurs α_1 -adrénergiques, récepteurs de l'endothéline, de l'angiotensine II). La phosphorylation par la PKC du canal au niveau des sous-unités Cav1.2 et β_{2a} participe à sa modulation (Kamp et Hell 2000) mais ses conséquences restent controversées (Benitah et al. 2010). La PKG module également l'activité du canal par différents mécanismes : par la phosphorylation directe du canal qui stimule son activité, par son rôle dans l'activation d'une protéine phosphatase qui déphosphoryle le canal, et par son action inhibitrice de la voie de la PKA par la diminution des niveaux d'AMPc (Mery et al. 1991 ; pour revues : van der Heyden et al. 2005 ; Fischmeister et al. 2006). Dans les deux derniers cas, l'action de la PKG se traduit par une diminution du courant $I_{\text{Ca,L}}$.

L'existence de ces mécanismes de régulation de l'activité du LTCC est d'autant plus importante compte-tenu du rôle de ces canaux dans le CEC en intervenant dans le remplissage du RS (Trafford et al. 1997) mais aussi et surtout dans le déclenchement de la libération du Ca^{2+} contenu dans le RS par induction du phénomène de CICR. Situés au niveau des tubules T, en regard des canaux Ca^{2+} situés à la membrane du RS (récepteurs à la ryanodine, RyR2) au niveau des diades (Scriven et al. 2000), l'influx de Ca^{2+} à travers le LTCC va permettre d'activer les RyR2 permettant ainsi une libération massive de Ca^{2+} du RS permettant de déclencher la contraction cellulaire.

3. Rôle prépondérant du RyR2 dans l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique

Le RS est un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération de Ca^{2+} . Il est formé de deux parties : le RS jonctionnel et le RS longitudinal. Ces deux parties, dans le prolongement l'une de l'autre, ont des fonctions distinctes. Le RS jonctionnel est constitué de citernes terminales situées en vis-à-vis des tubules T. Cette organisation particulière, appelée diade, permet de former un espace réduit où le Ca^{2+} issu de l'activation des LTCC peut, tout en limitant sa trop grande diffusion, rapidement atteindre les canaux Ca^{2+} de la membrane du RS, les RyR2, pour les activer et entraîner ainsi le relargage massif des réserves calciques intracellulaires (pour revue : Ferrantini et al. 2013 ; Kline et Mohler 2013). En effet, contrairement au muscle squelettique, où il existe un couplage physique entre les DHPR et les RyR1 squelettiques (Schneider et Chandler 1973), il n'y a pas de couplage direct entre les LTCC et les RyR2 cardiaques : un phénomène de CICR rapide et précis apparaît donc indispensable pour entraîner l'augmentation suffisante de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} permettant la contraction myocytaire.

Le RyR2, acteur de la libération des réserves de Ca^{2+} du RS, joue donc un rôle central et indispensable dans le CEC cardiaque. De fait, la délétion du gène codant pour le RyR2 provoque la mort à un stade embryonnaire chez la souris (Takeshima et al. 1998). Le RyR2 partage 70% d'homologie avec le RyR1, son homologue présent dans le muscle squelettique (Fill et Copello 2002). Si la cristallisation du canal complet n'a pas encore été réalisée, il est néanmoins établi que le RyR2 est un récepteur homotétramérique formé par quatre sous-unités d'environ 565 kDa chacune arrangées en regard les unes des autres, la région centrale formant le pore du canal (**Figure 4**). Chaque sous-unité, formée d'environ cinq-mille acides aminés, comprend une partie C-terminale qui forme l'entrée du pore du canal à la face luminale (dans la lumière du RS), une partie transmembranaire comprenant le pore du canal, et enfin une large partie N-terminale cytoplasmique appelée "pied" qui représente environ 80% du volume protéique et est impliquée dans la régulation du canal (Lehnart 2007). La partie transmembranaire de la protéine est formée de quatre à dix segments transmembranaires et d'une boucle peptidique appelée "boucle-P" car formant le pore permettant le passage des ions (Balshaw et al. 1999 ; pour revues : Ludtke et al. 2005 ; Zalk et al. 2015 pour analogie avec la structure du pore du RyR1), cependant l'organisation complète des RyR2 reste à définir. A l'échelle cellulaire, les RyR2 sont organisés à la surface du RS en groupes appelés "*clusters*" regroupant plus de cent RyR2 en regard de dix à vingt-

cinq LTCC, le ratio variant selon les espèces avec par exemple une moyenne de sept RyR2 pour un LTCC chez le rat (Bers et Stiffel 1993). Cette organisation permet de former des unités fonctionnelles de libération de Ca^{2+} (CRU pour *Ca^{2+} Release Units*) permettant un contrôle fin de la quantité de Ca^{2+} libéré par le nombre de CRU mobilisés (Bers 2002), la libération de Ca^{2+} par un cluster de RyR2 représentant un événement élémentaire de libération de Ca^{2+} appelée étincelle calcique ou "*Ca^{2+} spark*" (Cheng et al. 1993).

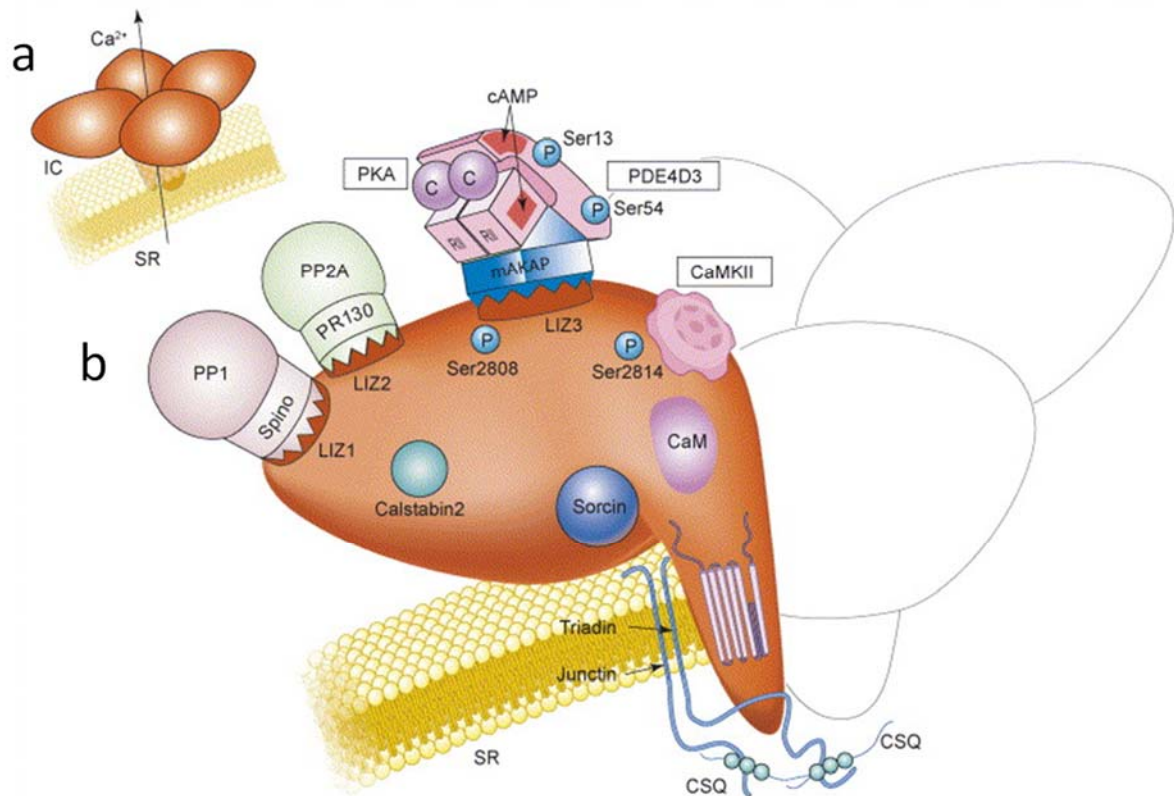


Figure 4 : Illustration schématique du récepteur de la ryanodine RyR2 et du complexe macromoléculaire

a. L'assemblage des quatre sous-unités identiques forme le complexe du RyR2, comprenant un large "pied" cytoplasmique et une région transmembranaire constituant le pore du canal pour le passage des ions Ca^{2+} vers le cytosol. **b.** Une sous-unité du RyR2 présente des domaines d'interaction avec différentes protéines et une région C-terminale transmembranaire incluant la structure en boucle responsable de la sélectivité du pore. La liaison de la calmoduline (CaM) et de la calstabin 2 (ou FKBP 12.6) implique des acides aminés spécifiques. Les motifs LIZ (leucine zipper) permettent la liaison du récepteur avec des protéines d'ancrage : la spinolipine (Spino), la PR130 et la mAKAP. La spinolipine et la PR130 ancrent respectivement les phosphatases PP1 et PP2A, alors que la mAKAP est capable de lier la PKA (formée de deux sous-unités régulatrices RII et de deux sous-unités catalytiques C) et la phosphodiesterase PDE4D3. Le RyR2 est phosphorylé par la PKA et la CaMKII sur deux sites différents (Ser 2808 et Ser 2814 respectivement). Les protéines triadin et junctin présentent chacune un domaine transmembranaire et interagissent avec le RyR2 et la calséquestrine (CSQ) qui lie le Ca^{2+} luminal et contribue à la modulation du canal. (d'après Lehnart 2007)

Le RyR2 est activé par le Ca^{2+} : si de faibles et de fortes concentrations de Ca^{2+} cytosolique, respectivement de l'ordre du nM et du mM, placent le RyR2 dans un état

inactivé, des concentrations de l'ordre du μM permettent son activation (Bezprozvanny et al. 1991). Cette régulation cationique de l'activité du RyR2 est basée sur la présence de deux sites de fixation du Ca^{2+} ayant une affinité variable, celui de haute affinité contrôlant l'activation et l'ouverture du canal et celui de faible affinité étant responsable de l'inactivation du RyR2. Le Mg^{2+} peut exercer une action inhibitrice sur le canal en se fixant sur ces sites de régulation cationique (Laver et al. 1997), néanmoins la concentration en Mg^{2+} étant relativement stable à l'état physiologique, le Ca^{2+} peut ainsi être considéré comme étant le seul cation divalent à exercer une régulation significative sur le canal. La cinétique d'augmentation de la concentration en Ca^{2+} au voisinage du RyR2 est également importante avec une probabilité d'ouverture du canal qui augmente avec la vitesse d'application du Ca^{2+} (Gyorke et Fill 1993). L'activité du RyR2 peut également être modulée par des alcaloïdes végétaux tels que la ryanodine, qui a donné son nom au canal, ou la caféine. La ryanodine, en se fixant sur deux sites de haute et de faible affinité situés sur l'extrémité C-terminale de la protéine, va avoir des effets opposés selon sa concentration : à faible concentration (de l'ordre de 10 nM) elle induit une fuite du RyR2 en maintenant le canal dans un état de sous-conductance, et à forte concentration (supérieure à 1 μM) elle bloque l'activité du RyR2 en maintenant le canal dans un état fermé (Buck et al. 1992 ; Zimanyi et al. 1992). La caféine augmente pour sa part la probabilité d'ouverture du canal, les durées moyennes d'ouverture du canal permettant une libération importante et transitoire du Ca^{2+} du RS aboutissant à la vidange de celui-ci (Rousseau et al. 1988).

Mais le RyR2 n'est pas seulement un canal, il est aussi à la base de la formation de véritables complexes macromoléculaires (**Figure 4**). Il est en effet associé à de nombreuses protéines qui, par leur interaction physique avec le RyR2 directe ou leur localisation à proximité de celui-ci *via* des protéines d'ancrage, vont être impliquées dans la régulation de son activité. On trouve notamment au niveau de l'extrémité N-terminale la calstabine 2, la calmoduline, la sorcine, des protéines phosphatases (PP1 et PP2A), des protéines kinases (PKA et CaMKII) ainsi que des phosphodiesterases (PDE) (Lacampagne et al. 2008). Les différentes régulations de l'activité du RyR2 par la PKA et la CaMKII sont controversées (Bers et Grandi 2009 ; Camors et Valdivia 2014) et seront, avec le rôle des PDE, décrits plus loin (voir II.B.1.c pour la PKA, III.B pour la CaMKII et II.C.2 pour les PDE).

La calstabine 2 ou FKBP 12.6 est une protéine qui agit sur l'activité du RyR2 uniquement de par son interaction physique avec le récepteur de la ryanodine. La fixation de la calstabine 2 sur le RyR2 (stœchiométrie de 1:1 avec chaque sous-unité de RyR2

(Jayaraman et al. 1992)) à la face cytoplasmique stabilise l'état fermé du canal : leur dissociation entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Brillantes et al. 1994) induisant des états de sous-conductance à l'origine d'une fuite en Ca^{2+} du RS en diastole qui est pro-arythmique (Wehrens et al. 2003). Il a également été montré que la calstabile 2 joue un rôle prépondérant dans la synchronisation des libérations de Ca^{2+} du RS par l'ouverture synchronisée des RyR2 (Berridge et al. 2003). La calmoduline (CaM) est une protéine ubiquitaire de 17 kDa comprenant deux lobes (C-terminal et N-terminal) et qui constitue le détecteur principal de Ca^{2+} au niveau des cellules eucaryotes. Ici, elle joue le rôle d'un détecteur de Ca^{2+} "associé", qui détecte les niveaux de Ca^{2+} dans le cytoplasme et interagit avec le RyR2 en fonction de ce paramètre. La CaM peut se fixer sur chaque monomère de RyR2 avec une stœchiométrie de 1:1 au niveau d'un domaine de fixation situé au niveau de la queue N-terminale du RyR2 (Balshaw et al. 2001). La fixation de la CaM sur le RyR2 exerce toujours une action inhibitrice du canal quelle que soit la concentration de Ca^{2+} . Par analogie avec l'effet de la CaM observé dans le muscle squelettique avec l'isoforme RyR1 (Xiong et al. 2002), Sorensen *et al.* ont récemment formulé l'hypothèse d'une régulation différentielle selon les lobes de la CaM impliqués dans l'interaction avec le RyR2 (Sorensen et al. 2013). Selon cette étude, dans le cas d'une faible concentration de Ca^{2+} cytosolique, la CaM non-liée au Ca^{2+} est responsable de l'inhibition du RyR2 *via* la fixation de son lobe C-terminal avec le RyR2 ; dans le cas d'une forte concentration en Ca^{2+} cytosolique, la CaM lie alors le Ca^{2+} *via* ses deux lobes entraînant là-encore une inhibition du RyR2 (Sorensen et al. 2013).

La sorcine est une protéine de 22 kDa de haute affinité pour le Ca^{2+} dont l'action sur le RyR2 à la face cytoplasmique est comparable à celle de la CaM en terme d'effet (liée au RyR2, elle exerce une action inhibitrice) mais dont l'action peut être modulée par sa phosphorylation (Farrell et al. 2003).

Le RyR2 est également associé à des protéines phosphatases (PP1 et PP2A) présentes au niveau de l'extrémité cytoplasmique du RyR2. PP1 et PP2A sont liées au RyR2 par deux protéines d'échafaudage distinctes : la spinophiline et la PR130 respectivement (Marx et al. 2001). La présence de ces phosphatases constitue un mécanisme de contrôle de l'activité du RyR2 en régulant l'état de phosphorylation du canal (balance l'activité des protéines kinases).

En plus de ces protéines régulatrices situées dans la partie cytoplasmique, le RyR2 interagit également avec d'autres protéines à l'intérieur du RS. Ces protéines luminales

comprennent des protéines détectrices de Ca^{2+} ainsi que des protéines d'échafaudage, et permettent une régulation du RyR2 en fonction de la concentration en Ca^{2+} du RS. Parmi ces protéines, la calséquestrine (CSQ) est certainement la plus connue (MacLennan et Wong 1971). Cette protéine, dont il existe deux isoformes CSQ1 (muscles squelettiques) et CSQ2 (isoforme cardiaque) (Gaburjakova et al. 2013), est retrouvée en forte concentration dans le RS jonctionnel. Sa structure a été cristallisée, et la CSQ2 est connue pour son fort pouvoir chélateur puis qu'elle peut fixer jusqu'à quarante ions Ca^{2+} (Wang et al. 1998). Elle n'interagit pas directement avec le RyR2, mais elle est liée de manière dépendante du Ca^{2+} à la triadine et la junctine qui sont deux protéines d'échafaudage transmembranaires qui interagissent avec le RyR2 (**Figure 4**) ce qui permet le positionnement de la CSQ2 à proximité directe du pore du RyR2 à sa face luminale (Zhang et al. 1997). La présence de telles protéines à fort pouvoir chélateur de Ca^{2+} permet de maintenir une forte concentration calcique dans le RS sous forme d'ions liés et libres, mais aussi un fonctionnement correct du RyR2 (Gyorke et al. 2004) par son rôle de chélateur de Ca^{2+} mais également indépendamment de son rôle tampon (Chopra et Knollmann 2009). Il a ainsi été montré que la CSQ2 joue un rôle dans la modulation de l'activité du RyR2 permettant une régulation des quantités de Ca^{2+} stockées dans le RS (Lukyanenko et al. 2001).

Les processus d'oxydoréduction sont également impliqués dans la régulation du RyR2. De façon générale, les éléments réducteurs ont un effet inhibiteur sur le canal alors que les oxydants sont activateurs (Prosser et al. 2011 ; Shan et al. 2012). Le monoxyde d'azote (NO) est considéré comme un modulateur physiologique de l'état redox du RyR2 par S-nitrosylation (Xu et al. 1998). L'oxydation de certaines fonctions thiols modifie également la sensibilité du canal au Ca^{2+} et au Mg^{2+} . Les effets d'agents oxydoréducteurs peuvent être directs ou également modifier les interactions de type protéine-protéine du complexe macromoléculaire. Dans ce contexte, il a été montré que des agents oxydants peuvent dissocier la CaM (Zhang et al. 1999) et, plus récemment, la calstabin 2 du RyR2 (Zissimopoulos et al. 2007).

4. Ca^{2+} et contraction : les myofilaments et leur fonctionnement

Lorsqu'on observe un cardiomyocyte ventriculaire en microscopie optique, on remarque l'existence d'un motif formé d'une striation régulière qui résulte de l'alternance de

bandes sombres et de bandes claires appelées bandes A (anisotropique) et I (isotropique) (Morimoto 2008) (**Figure 5**). La bande I est traversée en son milieu par la strie Z (pour *Zwischenscheibe*), et la bande A par la zone claire sur le schéma appelée zone H (pour *Hensen*), elle-même marquée en son centre par une ligne sombre M (pour *Mittlemembran*) (**Figure 5**). L'unité contractile du muscle est le sarcomère, qui correspond à la zone comprise entre deux stries Z. La répétition en série de sarcomères forme les myofibrilles et plusieurs myofibrilles sont nécessaires pour former une fibre musculaire. La longueur au repos d'un sarcomère est de 1,8 μm même s'il peut être étiré jusqu'à des valeurs d'environ 2,3 μm lors du remplissage cardiaque (Allen et al. 1974 ; Gordon et Pollack 1980). Le sarcomère est formé par des myofilaments composés de trois classes de protéines : les protéines contractiles comprenant les filaments épais de myosine (bande A sombre) et des filaments fins d'actine qui s'enchevêtrent au niveau de la zone C, les protéines régulatrices (troponine et tropomyosine) et les protéines structurales (protéine C de liaison à la myosine ou MyBP-C pour *myosin binding protein-C*, α -actinine et titine) (**Figure 6**). Chez les mammifères, les myofilaments occupent environ 50% du volume des myocytes ventriculaires.

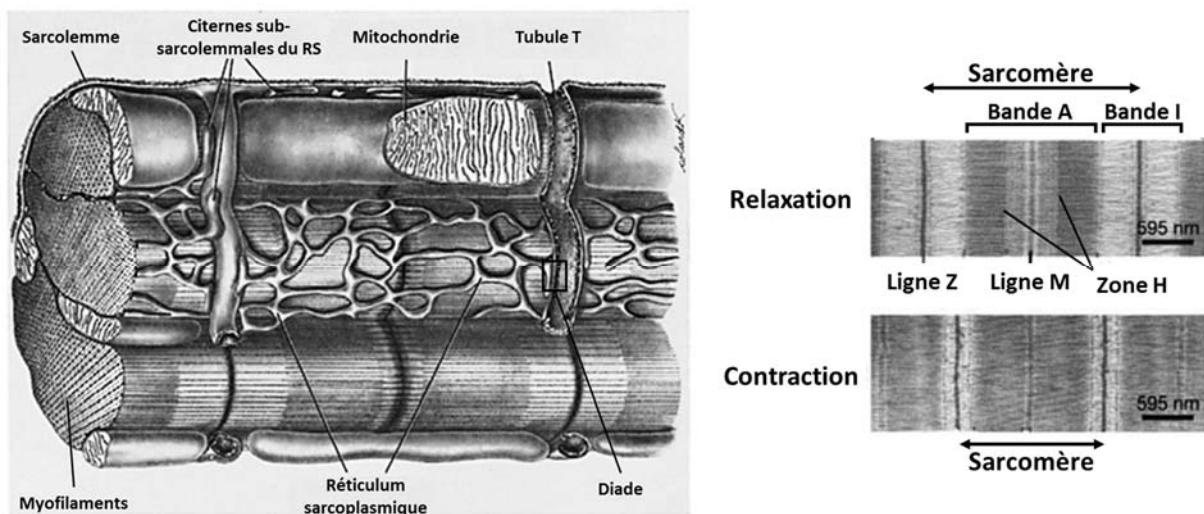


Figure 5 : Ultrastructure d'un myocyte cardiaque

Le sarcolemme constitue la membrane plasmique des cellules musculaires. Il forme des invaginations, les tubules T, répartis régulièrement au niveau des disques Z et formant un réseau continu et ramifié au sein de la cellule. La disposition des citernes terminales du RS en vis-à-vis immédiat des tubules T constitue la diade. La striation régulière du muscle résulte de l'alternance des bandes sombres (bandes A) et de bandes claires (bandes I). La bande I est traversée en son milieu par le disque Z. Entre deux disques Z, le sarcomère est l'unité contractile des cardiomyocytes, et la répétition en série de sarcomères forme les myofibrilles. Les mitochondries sont nombreuses dans les myocytes cardiaques, souvent insérées entre les myofibrilles ou juste sous la membrane plasmique. (modifié d'après Fawcett et McNutt 1969)

Les filaments épais sont constitués de 300 à 400 molécules de myosine, protéine hexamérique formée de six sous-unités : deux sous-unités lourdes MHC (*myosin heavy chain*) et deux paires de sous-unités légères MLC (*myosin light chain*) (Lowey et al. 1969 ; Weeds et Lowey 1971). L'extrémité C-terminale est constituée des deux chaînes lourdes enroulées en hélice α , et est reliée par une charnière flexible (fragment S2) à la tête globulaire (fragment S1). Cette dernière est formée pour sa part de l'extrémité N-terminale des chaînes lourdes et des chaînes légères, et elle possède un site de fixation de l'ATP ainsi qu'un site d'interaction avec l'actine (Rayment et al. 1993 ; Rayment et al. 1993). Différentes protéines associées aux filaments épais sont impliquées dans l'assemblage de ces filaments et la régulation de la contraction. La protéine MyBP-C s'enroule autour du filament épais et joue un rôle important dans la stabilisation et la modulation de ce dernier (pour revue : Craig et al. 2014). Elle possède des sites d'interaction avec les filaments de myosine, les filaments fins d'actine et la titine.

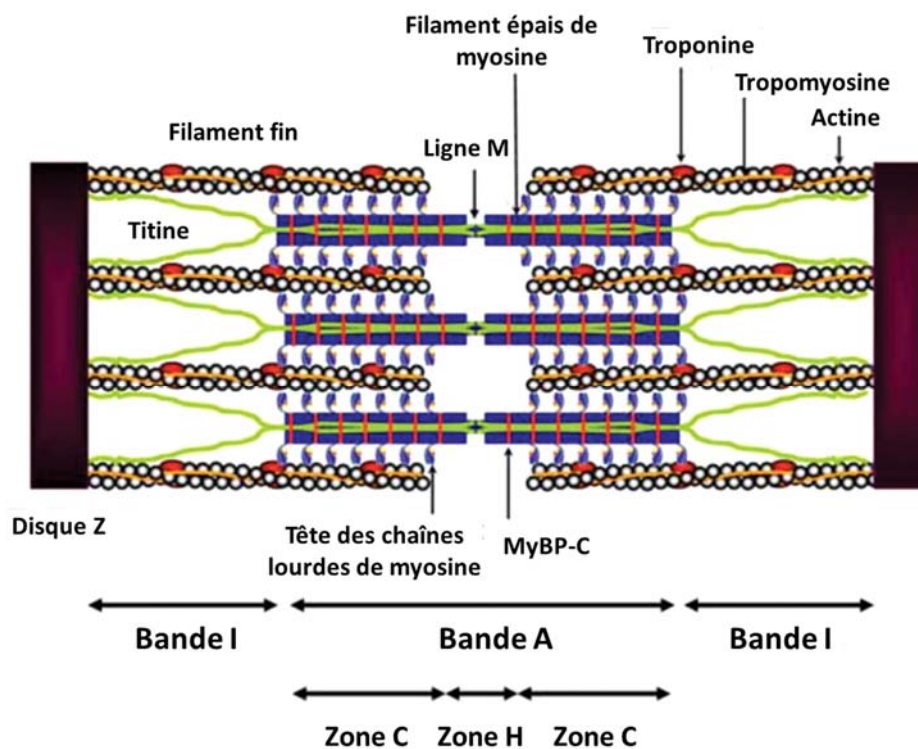


Figure 6 : Structure schématique du sarcomère

Les filaments fins d'actine représentent deux chaînes hélicoïdales qui s'entrecroisent. Dans la gouttière se trouve la tropomyosine à laquelle s'associe un complexe de troponine distribué le long du filament d'actine. Au niveau des filaments épais de myosine, la chaîne lourde de myosine (MHC) possède un domaine de tête globulaire contenant le site de liaison à l'actine et le site d'hydrolyse de l'ATP. La MyBP-C est une protéine associée au filament épais. La titine est une protéine géante qui s'étire du disque Z à la ligne M. (modifié d'après Morimoto 2008)

Les filaments fins d'actine sont composés de deux chaînes hélicoïdales qui s'enroulent l'une autour de l'autre (Holmes et al. 1990). Ils sont constitués de monomères d'actine globulaire (actine G) polymérisés en une forme filamenteuse (actine F) pouvant activer la Mg-ATPase de la myosine. Dans le sillon de l'actine F, se trouve la tropomyosine. Elle participe à la rigidité du filament fin et à la régulation de la contraction en bloquant l'interaction des têtes de myosine avec l'actine. A chaque tropomyosine est associée un complexe de 3 troponines (Tn) : la troponine T (*tropomyosin binding*) ou TnT qui se lie à la tropomyosine, la troponine C (Ca^{2+} *binding*) ou TnC qui fixe le Ca^{2+} et la troponine I (*inhibitory*) ou TnI qui fixe l'actine et inhibe la contraction (White et al. 1987).

Le sarcomère comprend également une autre protéine filamenteuse : la titine (pour revue : LeWinter et Granzier 2014). Les filaments élastiques de titine jouent un rôle important dans l'assemblage et la stabilité du sarcomère : en interagissant avec les filaments de myosine et la MyBP-C des filaments épais au niveau de la bande A d'un côté, et avec les filaments fins d'actine au niveau des disques Z tout en étant libre au niveau de la bande I (Furst et al. 1988), elle agit comme un élastique moléculaire permettant de limiter le degré d'extension de la cellule lors de la diastole (Granzier et Irving 1995) (**Figure 6**). Elle participe également à la rigidité cellulaire, au maintien correct des filaments entre eux durant la contraction, et enfin participe au retour à la longueur de repos de la cellule après la contraction (Granzier et Labeit 2004).

L'explication du mécanisme de la contraction repose sur la théorie des filaments glissants (Huxley et Niedergerke 1954 ; Huxley et Hanson 1954 et pour revue sur l'histoire de la découverte des mécanismes de la contraction : Huxley 2000). C'est le glissement des filaments épais par rapport aux filaments fins qui permet un raccourcissement des sarcomères et par conséquent du cardiomyocyte tout entier (**Figure 7**). Ce glissement est le résultat d'interactions entre les têtes globulaires de myosine et les filaments d'actine au niveau de la zone C où les deux filaments se recouvrent. Cette interaction active l'ATPase située au niveau de la tête de myosine qui, en clivant l'ATP en ADP + P_i , va libérer l'énergie nécessaire au changement de conformation du fragment S2 de la myosine se traduisant par le pivotement de la tête de myosine et donc le déplacement de la myosine par rapport à l'actine. Il en résulte un raccourcissement du sarcomère de manière cyclique du fait de la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP à la suite de la libération de l'ADP + P_i précédemment obtenu, permettant ainsi de décrocher la tête de myosine de l'actine (Chalovich et Eisenberg 1982). Comme ce

phénomène a lieu simultanément dans tous les sarcomères de la cellule, ceci aboutit au raccourcissement global du myocyte et donc à sa contraction.

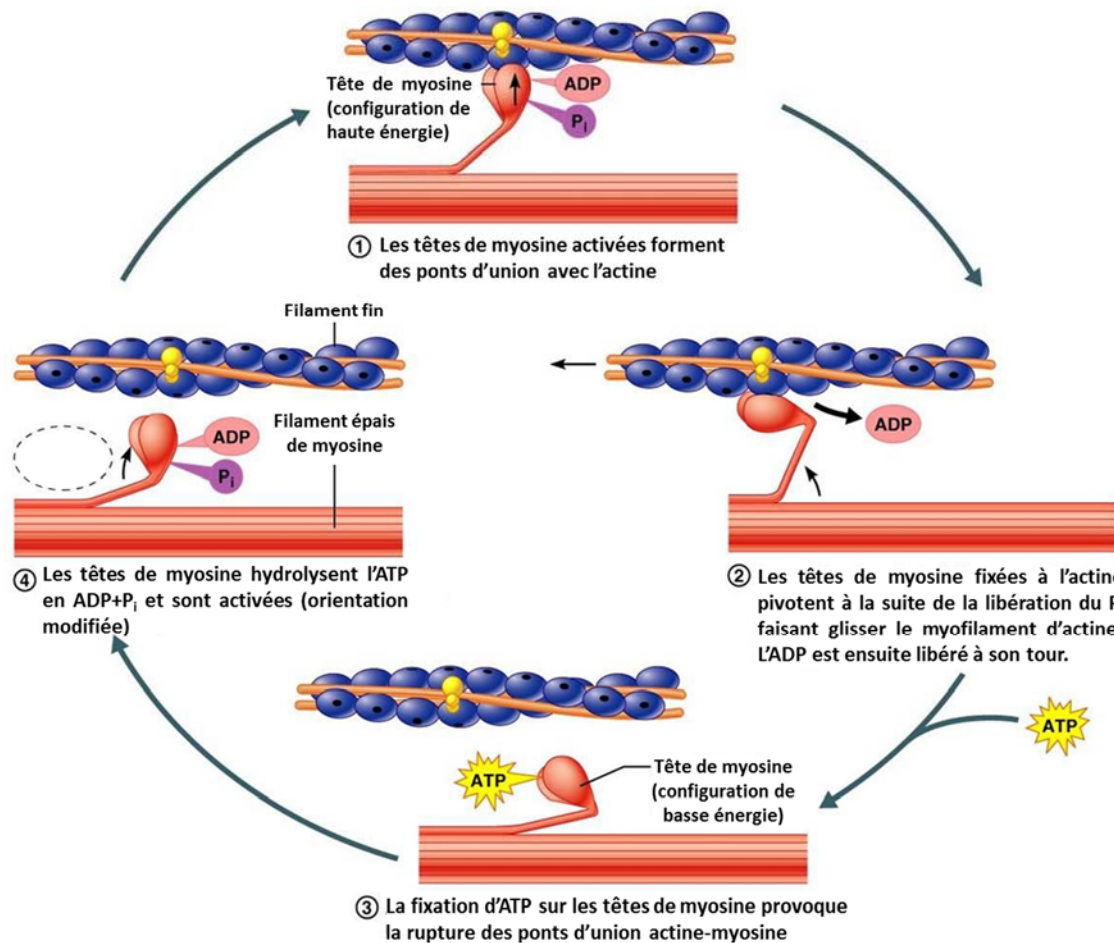


Figure 7 : Le cycle des ponts actine-myosine

En présence d'ATP, ADP et P_i sont liés aux têtes de myosine avec une haute affinité pour l'actine. La liaison à l'actine entraîne la libération d'ADP et P_i et un pivotement des têtes de myosine. Il en résulte un développement de la force et un glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine, entraînant un raccourcissement. Le cycle s'arrête à cette étape en l'absence d'ATP (*rigor mortis*). La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP sur les têtes de myosine diminue son affinité pour l'actine. La séparation actine/myosine entraîne l'hydrolyse de l'ATP en ADP + P_i et le cycle recommence. (modifié d'après Cummings, 2006)

Au repos, lorsque les concentrations de Ca^{2+} intracellulaires sont faibles (de l'ordre de 100 nM), les sites de fixation du Ca^{2+} sur les TnC sont libres. Cette configuration favorise l'interaction de la TnI avec l'actine des filaments fins plutôt qu'avec la TnC, favorisant ainsi l'éloignement du complexe tropomyosine-troponine vis-à-vis des filaments fins d'actine (**Figure 8**). Lors d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique vers des valeurs de l'ordre de μM en grande partie du fait de la libération des réserves calciques du RS (Bers 1997), les ions

Ca^{2+} se fixent sur le site régulateur unique de la TnC levant ainsi l'inhibition exercée par la TnI sur l'actine. Ceci se traduit par un pivotement du complexe actine-myosine sur les filaments d'actine démasquant ainsi le site d'interaction de la tête de myosine avec l'actine. Ceci permet la formation de ponts entre les deux protéines et ainsi le raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction des cardiomyocytes.

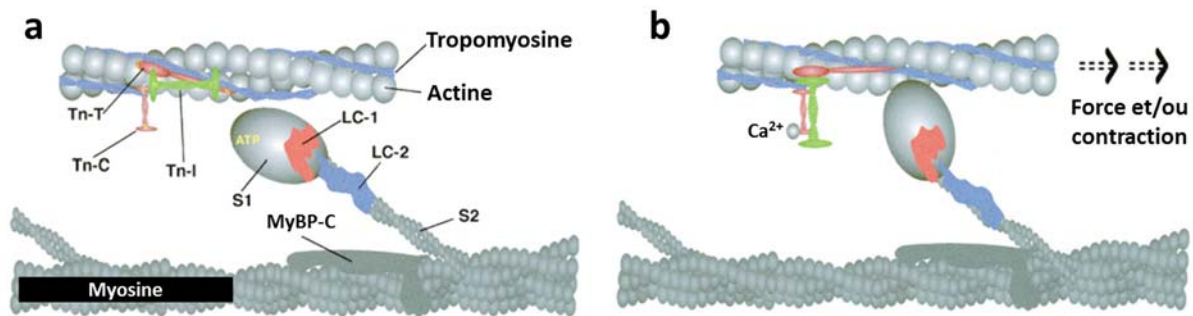


Figure 8 : Régulation Ca^{2+} -dépendante de l'interaction actine-myosine

a. Au repos, les sites de la TnC spécifiques du Ca^{2+} sont libres. Dans ce cas, l'interaction entre la TnI et la TnC est faible et la TnI interagit fortement avec l'actine. Ceci favorise l'éloignement du complexe troponine-tropomyosine avec les filaments d'actine, ce qui empêche la liaison de la tête de myosine à l'actine. **b.** La liaison du Ca^{2+} à la TnC induit un réarrangement conformationnel dans l'interaction Tn-Tm. Le mouvement de la Tm expose un site de liaison de la myosine sur l'actine permettant la formation de ponts actine-myosine. Ceci permet le développement d'une force et/ou contraction du sarcomère. (d'après de Tombe 2003)

5. Terminaison des signaux Ca^{2+} et relaxation

Pour effectuer son travail de pompe du système cardiovasculaire, le cœur doit alterner entre des phases de contraction permettant d'éjecter le sang des cavités cardiaques (systole), et des phases de relaxation (diastole) permettant un influx de sang dans les cavités précédemment vidées. Pour permettre la relaxation des cellules musculaires cardiaques, la concentration en Ca^{2+} dans le cytosol doit être diminuée afin d'induire un détachement des ions Ca^{2+} des myofilaments permettant leur relaxation (voir I.B.4). En plus du phénomène de fermeture des RyR2, dû notamment à la fixation du complexe Ca^{2+} -CaM sur son domaine cytoplasmique (voir I.3.3) qui participe à la diminution de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} par l'arrêt de la libération des réserves du RS, quatre autres mécanismes de limitation des niveaux de Ca^{2+} cytoplasmique sont impliqués. Ils font intervenir aussi bien des protéines permettant le repompage du Ca^{2+} dans le RS que des protéines permettant l'efflux de Ca^{2+} vers l'extérieur de la cellule, ou encore des transporteurs présents à la membrane mitochondriale.

a) *Repompage du Ca^{2+} dans le RS : rôle de SERCA et du PLB*

Lors de la relaxation cardiaque, la plupart du Ca^{2+} cytosolique est recapté par RS (de 70% dans certaines espèces jusqu'à 92% chez le rat) (Bers 1997). Ce recaptage se fait *via* une pompe Ca^{2+} spécialisée : la *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase* (SERCA) (Bers 2002). La SERCA est une protéine de 110 kDa, qui comprend une région transmembranaire formée d'hélices α et de deux régions de fixation du Ca^{2+} , et une région cytoplasmique siège des domaines de fixation de l'ATP et de son hydrolyse. La forme majoritairement exprimée dans le cœur est la SERCA2a (Lompre et al. 1994 ; Wu et al. 1995 ; pour revue : Vangheluwe et al. 2005). Localisée sur toute la membrane du RS longitudinal, elle assure un transport actif du Ca^{2+} vers la lumière du RS nécessitant donc l'hydrolyse d'ATP pour fonctionner. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP lui permet de faire rentrer deux ions Ca^{2+} dans le RS. Par cette activité, la SERCA2a joue un rôle primordial dans la diminution et le maintien des niveaux de Ca^{2+} cytoplasmiques à une valeur physiologique pendant la diastole.

La SERCA2a est associée à une protéine jouant un rôle d'inhibiteur constitutif : le phospholamban (PLB) (James et al. 1989). Dans le cœur, le PLB est exprimé de manière plus forte au niveau des ventricules plutôt qu'au niveau des oreillettes (Koss et al. 1995). A l'état inactif, ces protéines transmembranaires peuvent se regrouper sous forme de pentamères qui constituent des réservoirs inactifs (Wegener et Jones 1984 ; Wegener et al. 1986). Sous forme de monomère, le PLB peut interagir avec le domaine cytoplasmique de la SERCA2a et inhiber de manière réversible son activité en diminuant son affinité pour le Ca^{2+} ainsi que sa vitesse de repompage (Shannon et al. 2001). Durant la systole, lorsque les niveaux de Ca^{2+} sont augmentés, la fixation du Ca^{2+} sur la SERCA2a induit la dissociation partielle du PLB levant ainsi en partie son inhibition constitutive.

On peut également noter que l'activité de la SERCA2a au niveau cardiaque peut être modulée par la sarcolipine, une protéine présentant des similarités structurales avec le PLB. S'il a été montré qu'une surexpression de la sarcolipine diminuait la contractilité et les transitoires calciques enregistrées dans des cardiomyocytes ventriculaires de rat (Babu et al. 2005), la majorité des études montre cependant qu'elle est principalement exprimée dans les oreillettes, son niveau d'expression endogène très bas au niveau ventriculaire la rendant indétectable dans la majeure partie des études chez le rongeur comme chez le gros mammifère tel que le chien (Babu et al. 2007).

b) Extrusion du Ca^{2+} , NCX, PMCA et mitochondries

Si la SERCA2a représente le mécanisme majeur de diminution de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} en diastole, d'autres mécanismes concourent à cette diminution, notamment des mécanismes permettant l'extrusion de Ca^{2+} en dehors de la cellule afin de maintenir une concentration intracellulaire totale en Ca^{2+} constante en contrebalançant l'entrée de Ca^{2+} par le LTCC à l'origine du CICR. Ce mécanisme fait intervenir deux protéines : l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Reuter et Seitz 1968) et la Ca^{2+} -ATPase du sarcolemme (PMCA pour *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*).

L'extrusion de Ca^{2+} en dehors du cardiomyocyte ventriculaire se fait principalement par l'isoforme 1 du NCX (NCX1). Le NCX1 est une protéine de 108 kDa, comprenant neuf segments transmembranaires avec une boucle hydrophile entre les segments 5 et 6 (Matsuoka et al. 1993 ; Nicoll et al. 2002). Cet échangeur peut fonctionner de façon bidirectionnelle avec une stœchiométrie de 3:1 (échange d'un ion Ca^{2+} pour trois ions Na^+) ce qui en fait un transporteur électrogénique. Son activité dépend à la fois du potentiel membranaire et des gradients ioniques des ions qu'il transporte de part et d'autre du sarcolemme. Il joue un rôle important dans la morphologie du PA et plus particulièrement dans la phase du plateau du PA : si par son fonctionnement en mode inverse lors du pic du PA il permet la sortie des ions Na^+ provoquant une entrée de Ca^{2+} , l'augmentation rapide de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique due à l'activation du LTCC et à la libération des réserves de Ca^{2+} du RS provoque une inversion de ce courant d'échange I_{ti} en faveur d'une sortie de Ca^{2+} couplée à un influx d'ions Na^+ entraînant ainsi le prolongement de la dépolarisation membranaire (Luo et Rudy 1994 ; Priebe et Beuckelmann 1998 ; Winslow et al. 1999 ; pour revue : Janvier et Boyett 1996). Majoritairement situé au niveau des tubules T à proximité des diades, cette localisation lui permet aussi de réguler les niveaux de Ca^{2+} en synergie avec la SERCA2a et dans le même temps de limiter sa diffusion dans l'ensemble du cytoplasme (Chase et Orchard 2011). Afin de préserver une constance des niveaux de Ca^{2+} en diastole, le NCX (et à un degré moindre la PMCA) compense l'entrée de Ca^{2+} par les LTCC par son activité d'extrusion. Si le NCX semble être régulé par la PKC (sur les sites Ser 250 (majoritairement), Ser 249 et Ser 357) (Ballard et Schaffer 1996 ; Stengl et al. 1998) et la créatine kinase (Yang et Kao 2013), sa régulation par phosphorylation par la PKA est sujette à controverse comme nous le verrons dans le paragraphe II.B.1.c. En tant que principal acteur de la sortie de Ca^{2+} du myocyte, le NCX joue un rôle majeur dans la régulations des niveaux de Ca^{2+}

intracellulaires par action directe sur la concentration cytoplasmique et indirectement sur le contenu du RS (Sipido et al. 2002).

L'autre protéine permettant une extrusion du Ca^{2+} en dehors de la cellule est la PMCA. La PMCA est une protéine de 138 kDa dont la structure tridimensionnelle exacte n'est pas encore connue mais dont le fonctionnement est très proche de celle de la SERCA (pour revue : Lopreiato et al. 2014). On dénombre quatre isoformes nommées PMCA1-4, les isoformes 1 et 4 étant les principales au niveau cardiaque (Santiago-Garcia et al. 1996). Elles possèdent dix domaines transmembranaires, deux boucles cytoplasmiques principales et un domaine de liaison à la CaM au niveau de son extrémité cytoplasmique C-terminale (Shull et Greb 1988 ; Verma et al. 1988). Ce domaine joue ainsi un rôle d'auto-inhibiteur en permettant d'adapter l'affinité et donc l'activité de la pompe au Ca^{2+} en fonction de la concentration calcique cytoplasmique. Au repos, lors de la diastole, ce site d'auto-inhibition rend la pompe inactive par un mécanisme d'inhibition de contact. Lors d'une augmentation de Ca^{2+} dans le cytosol, ce mécanisme est levé par la fixation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ sur l'extrémité C-terminale levant son action auto-inhibitrice (Falchetto et al. 1991 ; Falchetto et al. 1992). Des sites de phosphorylation ont également été mis en évidence au niveau C-terminal, impliquant notamment deux résidus Ser et Thr spécifiques d'une phosphorylation par la PKC. Cependant, les effets liés à cette phosphorylation sont sujet à controverse puisque des résultats présentant des effets opposés ont été obtenus (Smallwood et al. 1988 ; Wang et al. 1991). La PMCA possède également un site de phosphorylation spécifique de la PKA, ceci sera discuté lors du paragraphe II.B.1.c. Si la PMCA présente une affinité élevée pour le Ca^{2+} , sa très faible vitesse de transport de l'ion (à elle-seule, elle ne permettrait la relaxation myocytaire qu'en 60 secondes environ) ne lui permet de jouer qu'un rôle secondaire dans l'orchestration des niveaux de Ca^{2+} au cours du CEC (Bers 2001). Il a été proposé que l'extrusion de Ca^{2+} par la PMCA n'a lieu qu'au niveau des tubules T (Chase et Orchard 2011).

Il faut également mentionner dans ces mécanismes le rôle des mitochondries. Chez les mammifères, les mitochondries occupent environ 35% du volume des myocytes ventriculaires et constituent le principal producteur d'ATP dans le myocyte, cependant elles ne représentent qu'environ 1% de la diminution de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} lors de la diastole (Bers 2001). Si elles ne constituent pas un réservoir principal de calcium pouvant influencer de manière significative sur le cycle du calcium en conditions physiologiques (Boyman et al. 2014), leur rôle dans la diminution du Ca^{2+} cytoplasmique n'est pas anodin. L'entrée d'ions Ca^{2+} se fait par l'uniporteur mitochondrial (Kirichok et al. 2004 ; Baughman et

al. 2011 ; De Stefani et al. 2011 ; Pan et al. 2013 ; pour revue : De Stefani et Rizzuto 2014), ceci permettant l'activation de déshydrogénases contrôlant ainsi la disponibilité des équivalents réduits nécessaires à la production d'ATP (pour revue : Brookes et al. 2004). Ces mécanismes permettent donc une adaptation de la production d'énergie lors d'une augmentation du travail myocytaire observés lors d'effets inotropes positifs comme lors d'une stimulation β -AR par exemple (Lacolley 2008). D'autres données indiquent que lors d'une surcharge calcique prolongée du myocyte, les mitochondries peuvent accumuler des quantités importantes de Ca^{2+} de manière temporaire. Ce mécanisme d'accumulation lente de Ca^{2+} permet ainsi de protéger la cellule de la toxicité d'une surcharge calcique.

c) Relaxation

A la suite de la fermeture des RyR2, du recaptage du Ca^{2+} pour reformer les réserves intracellulaires (par la SERCA2a au niveau du RS, et par l'uniporteur au niveau mitochondrial), ainsi que de l'extrusion du Ca^{2+} par le NCX et la PMCA, la concentration en Ca^{2+} dans le cytosol diminue pour retrouver son état d'équilibre diastolique. Cette diminution induit le détachement des ions Ca^{2+} des myofilaments permettant leur relaxation.

II. Régulation neuro-hormonale du CEC : la voie de l'AMPc dans le cœur

Afin d'adapter sa force et sa fréquence de contraction pour faire face à l'alternance entre des situations de stress (situations de danger, exercice) et de repos, la fonction cardiaque est régulée par différentes hormones et différents neuromédiateurs tels que le l'adrénaline/noradrénaline ou l'acétylcholine. En particulier, la balance entre les stimulations provenant des systèmes nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNP) permet une régulation des différents paramètres cardiaques que sont l'inotropisme (force de contraction développée), le chronotropisme (fréquence de contraction), le lusitropisme (vitesse de relaxation), le dromotropisme (vitesse de conduction des influx électriques) et le bathmotropisme (excitabilité des cardiomyocytes).

La stimulation parasympathique est médiée par l'acétylcholine (ACh) qui contrôle, en synergie avec le système sympathique, les fonctions végétatives de l'organisme. Au niveau cardiaque, l'ACh se fixe sur les récepteurs muscariniques M2 qui, *via* leur couplage avec des protéines G (liant le GTP) de type inhibiteur (G_i), vont entraîner une diminution de la fréquence cardiaque accompagnée d'une légère diminution de la force de contraction. La stimulation parasympathique s'oppose aux effets stimulateurs d'une stimulation sympathique, majoritairement caractérisée au niveau du myocyte ventriculaire par la fixation de catécholamines sur les récepteurs β -AR qui vont ainsi activer la voie de signalisation du second messenger intracellulaire adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPc). Cette augmentation de la concentration cytoplasmique d'AMPc stimule la fonction cardiaque en activant la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) qui phosphoryle les protéines clés du CEC induisant des effets inotrope, chronotrope, lusitrope, dromotrope et bathmotrope positifs (pour revue : Lissandron et Zaccolo 2006). Ce chapitre va se concentrer sur les acteurs et mécanismes impliqués dans la régulation neuro-hormonale du CEC par la voie de signalisation β -AR faisant intervenir dans un rôle central l'AMPc comme second messenger.

A. Synthèse de l'AMPc

L'AMPc a été identifié, notamment dans le cœur, au milieu du siècle dernier (Rall et Sutherland 1958). Depuis sa découverte, le rôle central de l'AMPc a pu être mis en évidence dans le cadre de plusieurs voies de signalisation découlant de l'activation de divers récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et stimulant la synthèse d'AMPc tels que les récepteurs à la prostaglandine E_1 , à l'histamine, au *glucagon-like peptide 1* ou aux β -AR en particulier dans le cœur. Si les premiers cités ne présentent que peu ou pas d'effet inotrope positif, les β -AR sont responsables d'une grande partie de l'augmentation de la fonction cardiaque lors d'une stimulation sympathique. Cette différence d'effets, observée notamment au niveau de la régulation du LTCC (Rochais et al. 2006), a ainsi permis de faire émerger l'idée d'une régulation neuro-hormonale du CEC par une voie de l'AMPc compartimentée (pour revue : Mika et al. 2012).

1. Les récepteurs β -adrénergiques

a) *Structure et fonctionnement*

Les récepteurs β -adrénergiques (récepteurs β -AR) font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G qui sont hétérotrimériques liant le GTP. Leur étude a été récompensée par le prix Nobel de Chimie 2012, conjointement décerné à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka. Les récepteurs β -AR sont formés par des hélices α correspondant aux segments transmembranaires de la protéine, qui sont connectées entre elles par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Ils possèdent un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal situé du côté cytoplasmique. La liaison du ligand au niveau extracellulaire induit un changement de conformation des segments transmembranaires 3 et 6 du récepteur permettant ainsi le couplage avec la protéine G qui se trouve alors activée (pour revue : Kobilka 2011). La protéine G hétérotrimérique est formée par trois sous-unités (α , β , γ) et, à l'état inactif, lie une molécule de guanosine diphosphate (GDP) au niveau de la sous-unité α . L'activation du récepteur β -AR entraîne un échange du GDP contre une molécule de guanosine triphosphate (GTP) et la dissociation de la sous-unité α des deux autres sous-unités qui restent associées sous forme de dimères (**Figure 9**). C'est la sous-unité α -GTP qui va, en se liant à l'adénylate cyclase (AC), moduler la production d'AMPc. Cette transition de l'information du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule est appelée "transduction du signal". Une fois la transduction du signal effectuée, l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité α permet l'hydrolyse du GTP en GDP. A nouveau liée au GDP, la sous-unité α se réassocie au dimère $\beta\gamma$ permettant l'arrêt de la transduction du signal. Ce processus est régulé par des protéines RGS (*regulator of G-protein signaling*) qui, en accélérant la capacité d'hydrolyse du GTP en GDP par la sous-unité α , permettent un retour rapide de la protéine G à l'état inactif (Pierce et al. 2002).

Il existe quatre formes différentes de sous-unités α classées selon leur séquence primaire et leur fonction dont les trois principales sont les protéines G stimulatrices des AC (G_s), inhibitrices des AC (G_i) et les protéines G_q qui stimulent la phospholipase C (Cabrera-Vera et al. 2003).

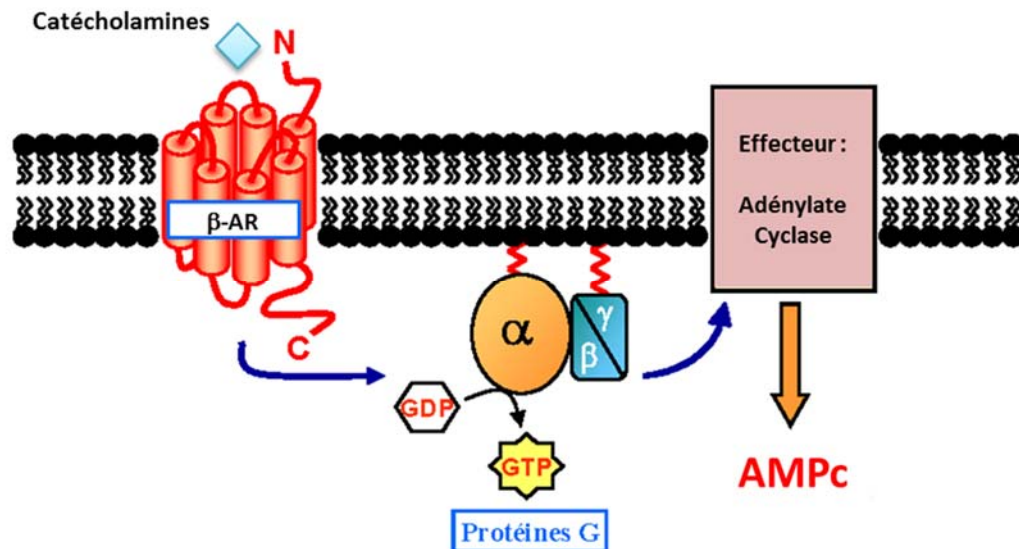


Figure 9 : Voie canonique de signalisation des récepteurs β -AR

Les récepteurs β -AR sont formés de sept segments transmembranaires connectés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Lors de la fixation du ligand, le changement de conformation du récepteur permet l'échange du GDP contre du GTP ce qui active la protéine G hétérotrimérique composée de $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$. La dissociation de ces sous-unités permet d'activer l'adénylate cyclase productrice du second messager : l'AMPc. (d'après Bockaert et Pin 1999)

b) Régulation du CEC

On dénombre actuellement trois types de β -AR : β_1 , β_2 et β_3 (Lands et al. 1967 ; Frielle et al. 1987 ; Kobilka et al. 1987 ; Emorine et al. 1989). Les trois types de β -AR sont exprimés dans le cœur mais à des degrés différents, degrés qui diffèrent de surcroît d'une espèce à l'autre, mais aussi en fonction de l'âge (Dobson et al. 2003). La voie classique de signalisation des récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR, qui représentent la grande majorité des β -AR en conditions physiologiques, est constituée par les protéines Gs qui stimulent la production d'AMPc et conduisent à l'activation de la PKA principalement.

Les β_1 -AR sont présents chez l'Homme dans toutes les régions du cœur et prédominent dans le ventricule de mammifère avec un ratio β_1 -AR/ β_2 -AR variant de 60/40% chez le rat à 93/7% chez le cochon d'inde, la prédominance des β_1 -AR étant chez l'Homme avec un ratio de 73/27% (Kompa et al. 1995 ; Brodde 1996 ; Anthonio et al. 2000). D'une manière générale, les β_1 -AR sont connus pour exercer des effets chronotrope, inotrope, et lusitrope puissants (Brodde 1996 ; Anthonio et al. 2000). Les effets observés au niveau ventriculaire (inotropisme et lusitropisme) sont dus à la phosphorylation des LTCC, du PLB,

des RyR2, de la TnI et de la MyBP-C (Xiao et Lakatta 1993 ; Steinberg 1999 ; Berridge et al. 2003 ; Xiao et al. 2004). Il faut toutefois noter la description d'un mécanisme dépendant de la PKA d'antagonisme des effets inotropes positifs observés impliquant l'activation de la phosphatidyl-inositol-3-kinase γ (PI3K γ) qui inhibe le courant Ca^{2+} $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ pénétrant dans la cellule *via* les LTCC (Leblais et al. 2004). Une activation prolongée des β_1 -AR a également été démontrée comme responsable de l'activation d'une autre protéine kinase par une voie indépendante de la PKA (Grimm et Brown 2010). Cette nouvelle voie de signalisation qui fait intervenir Epac et active la CaMKII sera détaillée dans le chapitre III. Lors d'une stimulation prolongée des β_1 -AR, il existe un mécanisme de rétrocontrôle par désensibilisation des récepteurs qui sera abordé dans la partie c) de ce chapitre.

Les β_2 -AR exercent pour leur part des effets plus modérés, principalement dus à deux phénomènes. Tout d'abord, il a été observé une restriction de son rôle principalement à la phosphorylation des LTCC du fait de sa localisation au niveau des cavéoles (au sein d'un complexe comprenant également la cavéoline-3, le LTCC, la sous-unité α de la protéine G_s , l'AC, la PKA et la PP2A (Balijepalli et al. 2006)). De plus, il existe une forte compartimentation des signaux AMPc issus des β_2 -AR limitant ainsi la diffusion du second messager à l'ensemble de la cellule (Nikolaev et al. 2006). De plus, de nombreuses études ont démontré que les β_2 -AR ne sont pas seulement couplés aux protéines G_s mais peuvent aussi être couplés aux protéines G_i dont l'activation inhibe la production d'AMPc ce qui antagonise les effets classiques de la voie PKA médiés par les protéines G_s (Xiao et al. 1995 ; Kuschel et al. 1999 ; Xiao et al. 1999 ; Siedlecka et al. 2008). Ces effets différentiels entre β_1 -AR et β_2 -AR corréleraient par ailleurs avec les résultats obtenus dans des animaux présentant une délétion des gènes codant pour chacun des deux récepteurs et qui indiquent que les catécholamines n'ont aucun effet inotrope dans les souris β_1 -AR KO alors que leur effet n'est pas modifié dans les souris β_2 -AR KO par rapport aux sauvages (Rohrer et al. 1999). En plus de ces effets inotropes, il est intéressant de noter que plusieurs études indiquent que les récepteurs β_2 -AR exercent également un effet anti-apoptotique dans les cardiomyocytes de rats. Ces effets β_2 -AR cardioprotecteurs sont médiés par la voie β_2 -AR- G_i impliquant la sous unité $\beta\gamma$, la phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K) et la kinase Akt (Zhu et al. 2001). La famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase) est également impliquée dans la réponse β_2 -AR- G_i anti-apoptotique par une activation de la phospholipase A2 (PLA2) qui induit une libération d'acide arachidonique et une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire responsable de l'effet inotrope positif (Pavoine et al. 1999 ; Pavoine et Defer 2005).

Dans le cœur, les β_3 -AR sont principalement présents au niveau des cellules endothéliales des petits vaisseaux, mais leur présence au niveau ventriculaire a pu être mise en évidence à la fois chez la souris, le chien et l'Homme (Gauthier et al. 1996 ; Tavernier et al. 2003 ; Xiang et Kobilka 2003). Une stimulation des β_3 -AR chez l'Homme a pour conséquence une diminution de la force de contraction ventriculaire par un mécanisme impliquant la petite protéine G_i (Gauthier et al. 1996) qui active une NO synthase de type endothéliale responsable d'une production de NO et de GMPc par la guanylate cyclase soluble. Le GMPc ainsi produit active la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) qui phosphoryle la TnI, réduisant la sensibilité au Ca^{2+} des myofilaments ; cet effet s'ajoute à l'effet inhibiteur du NO sur les LTCC (Mery et al. 1991). De plus faibles réponses ont été reportées chez le rat et le cobaye. Contrairement aux autres types de récepteurs β -AR, et en particulier aux β_1 -AR, les β_3 -AR sont relativement peu touchés par les mécanismes de désensibilisation (Bond et Lefkowitz 1996). Ceci pourrait être lié à l'absence de la plupart des sites de phosphorylation par les protéines kinases couplées aux RCPG retrouvés sur les β -AR de type 1 et 2 (Liggett et al. 1993). Dans le ventricule cardiaque, la stimulation des récepteurs β_3 -AR conduit donc à un effet de frein de la fonction cardiaque qui est opposé à celui observé avec une activation des récepteurs β_1 - et β_2 -AR. Ces mécanismes antagonistes doivent permettre une régulation fine des effets d'une stimulation β -AR sur la fonction cardiaque, les récepteurs β_3 -AR interviendraient ainsi lors de stimulations adrénérgiques intenses en limitant les effets inotrope positif et pro-hypertrophiques des catécholamines dû à l'activation β_1 - et β_2 -AR. L'hypothèse d'une action de rétrocontrôle a d'ailleurs été étayée très récemment avec une étude montrant qu'une surexpression de β_3 -AR humains chez la souris permet d'inhiber la réponse hypertrophique induite par une stimulation de la voie β -AR par l'isoprénaline (agoniste non-spécifique des β -AR) sans modifier la morphologie cardiaque basale, et que ce mécanisme est dépendant de la production de NO et de l'activation de la PKG (Belge et al. 2014). Ainsi, la surexpression des β_3 -AR observée dans l'insuffisance cardiaque (IC) (Moniotte et al. 2001), qui contraste avec la diminution d'expression des β_1 -AR, pourrait constituer un mécanisme destiné à limiter la progression de la pathologie.

A titre de comparaison entre les différents tissus cardiaques, il est intéressant de noter que les β_3 -AR sont exprimés de manière plus importante dans l'oreillette humaine et que, cette fois-ci, leur activation augmente la contractilité du tissu atrial et stimule les LTCC *via* la voie de l'AMPc (Skeberdis et al. 2008). Ces différences de résultats obtenus, avec un effet

potentialisateur en opposition avec les effets protecteurs des β_3 -AR décrits dans le paragraphe précédent, pourraient être dus à la différence de tissus étudiés et de méthodologies employées.

c) *Désensibilisation*

Si une activation aigüe des β -AR est bénéfique pour le cœur, puisqu'elle permet d'adapter la fonction cardiaque pour faire face aux besoins accrus de l'organisme en un instant donné, une activation prolongée des β -AR couplés à la protéine G_s a été démontrée comme responsable de l'apparition d'effets délétères dus à l'hyperphosphorylation de protéines clés du CEC par la PKA et/ou la CaMKII (Yoo et al. 2009 ; Grimm et al. 2011 ; Bers 2014). Cette hyperphosphorylation entraîne une dérégulation de l'homéostasie Ca^{2+} et aboutit à un développement d'une hypertrophie cardiaque pouvant se dégrader en IC où l'on observe une dysfonction du cœur marquée, entre autres, par un défaut de contractilité et la survenue d'arythmies (mécanismes décrits dans le chapitre IV), ou encore la mort cellulaire par apoptose (Communal et al. 1999). Afin de limiter les effets délétères cités ci-dessus, il existe deux mécanismes de désensibilisation des β -AR activés lors d'une stimulation prolongée (de l'ordre de la minute). En effet, une activation prolongée des β -AR peut être limitée par sa phosphorylation par la PKA sur le résidu Ser 262 situé au niveau de la troisième boucle intracellulaire (Tran et al. 2004), on parle de désensibilisation hétérologue (Hausdorff et al. 1989 ; Lohse et al. 1990), mais une activation persistante des β -AR peut également déclencher leur internalisation supprimant ainsi la possibilité de fixation de nouvelles catécholamines libérées sur le récepteur du côté extracellulaire (Lefkowitz et Shenoy 2005). Ce dernier mécanisme, appelé désensibilisation homologue, fait intervenir des protéines kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK pour *G-protein coupled receptor kinase*, principalement la GRK2 dans le cœur mais aussi la GRK5), la β -arrestine, et des protéines d'endocytose telles que la clathrine (**Figure 10**). Lors d'une stimulation prolongée, la dissociation du complexe $\beta\gamma$ des protéines G favorise la translocation de la protéine GRK2 (également appelée β -ARK1) et son adressage à la membrane. Au niveau de la membrane, GRK2 (dont l'activité peut être potentialisée par sa phosphorylation sur la Ser 685 par la PKA, voir : Cong et al. 2001) phosphoryle les résidus Ser 355, 356 et 364 (Vaughan et al. 2006) situés sur l'extrémité C-terminale du β -AR activé entraînant le recrutement et de la β -arrestine et son association avec le β -AR. Cette association empêche toute interaction du

complexe ainsi formé avec une AC bloquant ainsi la production d'AMPc (Lefkowitz 1993). Cette étape de désensibilisation par liaison avec une molécule chaperonne peut se poursuivre par une étape d'endocytose du récepteur : la β -arrestine peut interagir avec des molécules de clathrine permettant une internalisation du récepteur dans des vésicules. Le β -AR peut alors soit être recyclé en étant ré-adressé à la membrane sous sa forme activable, soit être définitivement dégradé. Si la désensibilisation des β -AR est très largement considérée comme un mécanisme adaptatif de protection pour la cellule, il faut néanmoins noter quelques études qui la présentent comme un mécanisme maladaptif car son inhibition permettrait d'améliorer la fonction cardiaque (White et al. 2000 ; Shah et al. 2001).

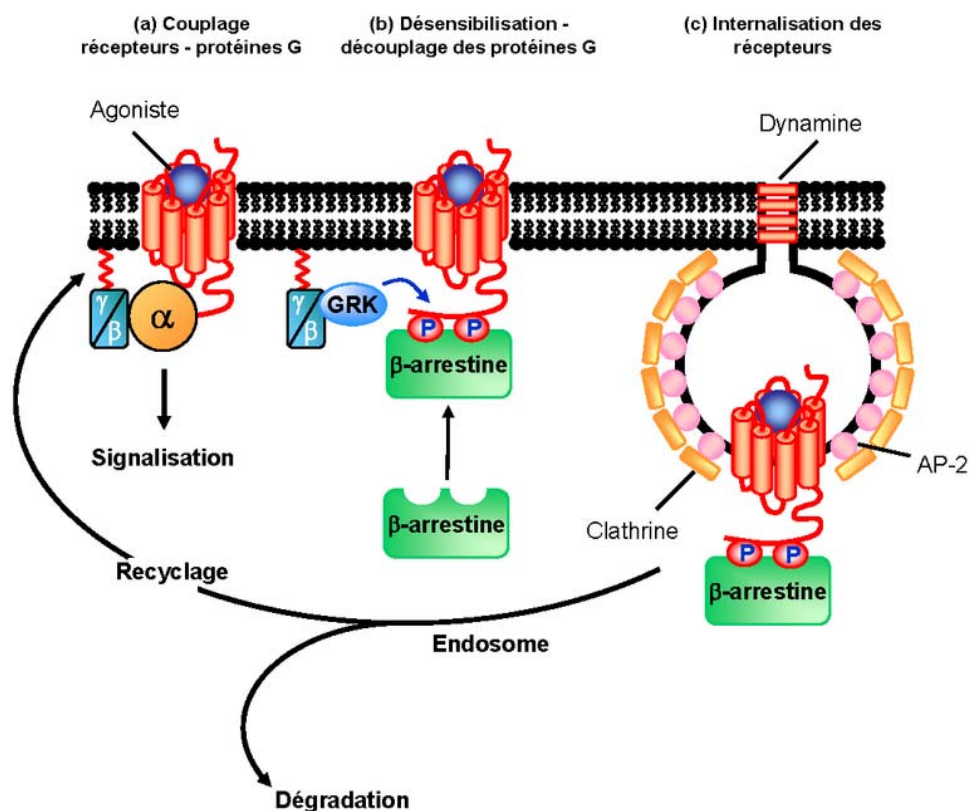


Figure 10 : Désensibilisation des récepteurs β -AR

(a) Lorsque le ligand se lie sur le récepteur, il active les protéines G. **(b)** La protéine kinase A (PKA) et les « G protein receptor associated kinase » (GRK) phosphorylent le récepteur. A ce moment, le récepteur est fonctionnellement découplé des protéines G et son affinité augmente pour les β -arrestines. **(c)** La fixation de la β -arrestine sur le récepteur empêche toute nouvelle activation d'autres protéines G. En outre, la β -arrestine (liée à son adaptateur « adapter protein-2 » (AP-2)) est capable de se lier à la clathrine pour permettre l'endocytose du récepteur. Dans les endosomes, les phosphatases garantissent le recyclage du récepteur pour autoriser son retour à la membrane, mais il peut aussi être dirigé vers les lysosomes où il sera dégradé. (d'après D. Maurel - commons.wikimedia.org)

Il faut également noter que la β -arrestine impliquée dans la désensibilisation des RCPG peut également servir de protéine échafaudage, permettant la formation de complexes de signalisation. Il a ainsi été montré en 2010 qu'une stimulation des β_1 -AR induit la formation d'un complexe regroupant la β -arrestine, le facteur d'échange des petites protéines G Epac1, et la CaMKII. La formation de ce complexe macromoléculaire et son recrutement à la membrane au niveau des β_1 -AR occupés par un agoniste permet d'expliquer l'activation d'Epac et de CaMKII observée lors de stimulations β_1 -AR soutenues (Mangmool et al. 2010). Cette voie de signalisation sera abordée plus en détail dans le chapitre III.

2. Les adénylate cyclases : le siège de la synthèse d'AMPc

En tant que moteur de la synthèse d'AMPc, les adénylate cyclases (AC) représentent des enzymes clés dans le processus de transduction du signal et dans la régulation de la fonction cardiaque. Cette famille d'enzymes, qui permet la production d'AMPc et de pyrophosphate inorganique (PPi) à partir du clivage de l'ATP, constitue l'unique source d'AMPc et le premier représentant a été cloné pour la première fois en 1989 (Krupinski et al. 1989). Elle comprend dix isoformes différentes chez les mammifères : neuf isoformes transmembranaires (AC1-9) et une isoforme soluble (ACs). Cette dernière a récemment été montrée comme exprimée dans le cœur et plus particulièrement au niveau mitochondrial. Les ACs, activées par le bicarbonate (HCO_3^-) et le Ca^{2+} mais insensibles aux activateurs des formes transmembranaires (protéines G et forskoline), y jouent un rôle dans l'activation de la voie pro-apoptotique dans les cas d'ischémie-reperfusion (voie PKA - Bax - dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) - cytochrome c - caspases 9/3 (Chen et al. 2012) et dans la régulation de la phosphorylation oxydative et de la synthèse d'ATP au niveau de la matrice mitochondriale (Krupinski et al. 1989 ; Di Benedetto et al. 2013). Les AC1 et AC8 sont également présentes au niveau cardiaque et plus précisément dans les cellules du nœud sinoatrial où elles pourraient jouer un rôle dans la régulation de la génération d'impulsions électriques rythmiques à l'origine de l'automatisme cardiaque car activées par le Ca^{2+} (Mattick et al. 2007 ; Younes et al. 2008).

Cependant, les principales isoformes responsables de la production d'AMPc dans le cœur sont les AC5 et AC6 (Guellich et al. 2014). Comme toutes les autres AC transmembranaires, elles sont composées de deux domaines hydrophobes M1 et M2 de six

segments transmembranaires chacun et de deux boucles cytoplasmiques C1 et C2 subdivisées en C1a, C1b et C2a, C2b (**Figure 11**). Les domaines C1a et C2a sont très conservés et s'hétérodimérisent pour former le site catalytique de l'AC avec les sites de fixation de l'ATP et la forskoline. Le domaine C1b qui assure le lien entre M2 et C1a peut être régulé positivement par le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (dans le cas des isoformes AC1, 3 et 8) et possède, dans le cas des AC5 et AC6, un site de phosphorylation pour la PKA, cette phosphorylation inhibant les AC5/6 (Iwami et al. 1995 ; Chen et al. 1997). Le domaine C2b n'est présent que dans les isoformes AC1 à 3 et AC8 (Pavan et al. 2009). Le domaine C1a joue un rôle structural très important dans les isoformes AC1, 3, 5, 6 et 8 puisqu'il contient le site de liaison pour la sous-unité α de la protéine G_i alors que la région C2a possède un site de liaison pour les sous-unités α et $\beta\gamma$ des protéines G_s ainsi qu'un site de phosphorylation pour la PKC. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont toutes les deux intra-cytoplasmiques et sont impliquées dans la régulation de l'activité de l'AC en contrôlant son interaction avec ses protéines partenaires. Les AC5 et AC6 sont toutes les deux activées par la sous-unité α de la protéine G_s et inhibées par la sous-unité α de la protéine G_i , la PKA et par des concentrations de Ca^{2+} supérieures au μM : l'inhibition des AC par la PKA se produit par phosphorylation du résidu Ser 674 (Chen et al. 1997) qui diminue la capacité des protéines G_s à activer la production d'AMPc (Beazely et Watts 2006). Les isoformes AC1 à AC8 (mais pas les AC9 et ACs) peuvent être stimulées par la forskoline, un diterpène extrait de la plante *Coleus forskohlii* (Hanoune et Defer 2001). Les AC sont aussi activées par les ions Mn^{2+} et inhibées par les inhibiteurs du site P, des analogues de l'adénosine (3'-AMP, 2'-deoxy-3'-AMP) (Sunahara et al. 1996 ; Hurley 1999). Les AC5 et 6 subissent également des modifications post-traductionnelles impactant leur activité. L'AC6 peut notamment être glycosylée au niveau de sa région M2 (Wu et al. 2001), ou être inhibée par une S-nitrosylation NO-dépendante (McVey et al. 1999). Une différence notable entre ces deux familles d'AC résulte dans leur réponse diamétralement opposée lorsqu'elles sont phosphorylées par la PKC : alors qu'une phosphorylation par PKC α ou PKC ξ stimule l'activité de l'AC5, une phosphorylation par PKC δ ou PKC ϵ inhibe l'AC6 (Hanoune et Defer 2001). Il a également été montré qu'au cours du développement cardiaque ontogénique, les isoformes AC5 et AC6 présentent une régulation opposée de leur expression. L'expression de l'AC6 est ainsi très forte dans le cœur fœtal, puis diminue progressivement avec l'âge jusqu'à atteindre des niveaux relativement faibles à l'âge adulte (Espinasse et al. 1995). Le profil d'expression de l'AC5 est, *a contrario*, faible chez le fœtus et maximal au stade adulte.

(Espinasse et al. 1995). De façon intéressante, les deux isoformes AC5 et AC6 semblent exercer des effets opposés dans le cœur. En effet, si la surexpression cardiaque de l'AC6 semble jouer un rôle protecteur (Phan et al. 2007), c'est l'invalidation de l'AC5 qui permet d'augmenter la longévité et de protéger le cœur contre un stress (Vatner et al. 2009), la surexpression de l'AC5 dans des souris transgéniques présentant des effets délétères marqués (Hanoune et Defer 2001 ; Lai et al. 2013 ; pour revue, voir : Guellich et al. 2014).

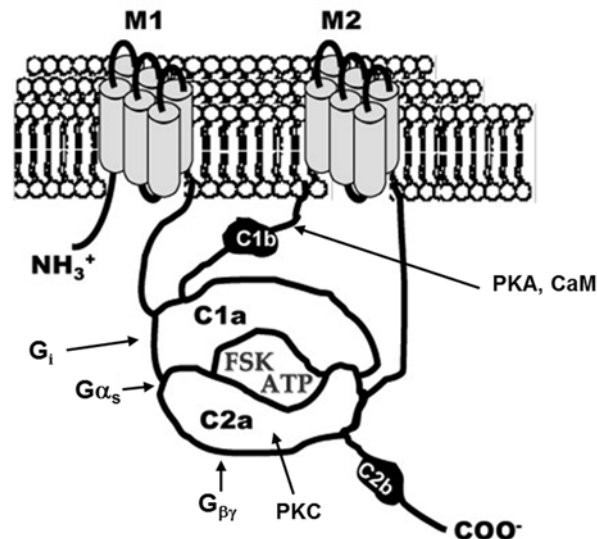


Figure 11 : Structure schématique des adénylate cyclases transmembranaires (AC)

M1 et M2 sont deux régions formées chacune de six segments transmembranaires séparées par les régions cytoplasmiques C1 et C2. L'hétérodimérisation de C1a et C2a constitue le domaine catalytique de l'enzyme avec les sites de fixation opposés pour l'ATP et la forskoline, un activateur des AC. C2a contient le site de fixation pour la protéine G_s et C1a pour la protéine G_i. Les domaines C1b et C2b sont non catalytiques. C2b n'est présent que dans les isoformes AC1, 2, 3, 8. Le domaine C1b peut être phosphorylé par la PKA (AC5/6) et modulé par la calmoduline (CaM) (pour les AC 1, 3, 8). (Adapté de Pavan et al. 2009)

B. Effecteurs de l'AMPc

Une fois produit par l'AC, l'AMPc peut agir sur trois effecteurs différents : la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) qui représente la principale cible de l'AMPc responsable de la modulation de la fonction cardiaque lors d'une stimulation β-AR, le facteur d'échange des petites protéines G Epac (pour *Exchange protein directly activated by cAMP*), les canaux HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) responsables de l'automatisme cardiaque (pour revue : Fischmeister et al. 2006). Une quatrième famille de protéines membranaires contenant un domaine nommé Popeye représente une nouvelle classe de protéines liant l'AMPc. Ces protéines, nommées Popdc, sont codées par trois gènes

(*Popdc* 1-3). Elles interagissent avec les canaux K^+ à deux pores TREK-1 et modulent le courant associé de façon AMPc-dépendante. Elles sont abondamment exprimées au niveau du tissu nodal cardiaque et du système de conduction et leur absence chez la souris conduit à des arythmies sinusales et à une bradycardie qui augmente avec l'âge (Froese et al. 2012). Etant donné leur découverte récente, leur rôle n'est pas bien compris en particulier dans le myocyte ventriculaire. Une étude récente suggère que *Popdc1* est associée à la cavéoline-3 et l'invalidation de *Popdc1* chez la souris augmente la sensibilité du cœur aux dommages induits par un protocole d'ischémie-reperfusion (Alcalay et al. 2013).

1. La protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA)

La PKA appartient à la famille des protéines kinases qui jouent un rôle essentiel dans la modulation de nombreux acteurs des processus biologiques. Le rôle des protéines kinases telles que la PKA est de transférer le troisième groupement phosphate situé à l'extrémité de la molécule d'ATP (phosphate γ) sur la protéine substrat. La PKA est une Ser/Thr protéine kinase. L'addition d'un groupement phosphate à la protéine cible va permettre de modifier son activité, sa localisation ou encore son affinité pour se lier à d'autres protéines cibles (Zhang et al. 2013).

a) Structure et régulation de la PKA

La PKA a été l'une des premières protéines kinases découvertes, séquencées, clonées et cristallisées (Walsh et al. 1968 ; Shoji et al. 1981 ; Uhler et al. 1986 ; Knighton et al. 1991). Il s'agit d'un hétérotétramère composé de deux sous-unités catalytiques (nommées sous-unités C) liées de façon non-covalente à deux sous-unités régulatrices (nommées sous-unités R) (**Figure 12**). Chaque sous-unité régulatrice comporte deux sites de fixation de l'AMPc nommés A et B. A l'état inactif, ces deux sites ne sont pas occupés. Lors d'une augmentation de la concentration en AMPc au voisinage de la PKA, une première molécule d'AMPc va d'abord venir se fixer sur le site B. Le site B occupé par une molécule d'AMPc va rendre le site A disponible pour fixer une seconde molécule d'AMPc par une modification stérique intramoléculaire. Lorsque les deux sous-unités régulatrices ont fixé au total quatre molécules d'AMPc, ceci induit un changement conformationnel de la PKA qui voit alors ses deux sous-unités R se dissocier des sous-unités C (Francis et Corbin 1994). Les sous-unités C

ainsi libérées deviennent actives et peuvent donc phosphoryler les résidus Ser et Thr des protéines cibles. C'est la diminution de la concentration en AMPc au voisinage de la PKA qui va entraîner le détachement du second messager des sous-unités régulatrices aboutissant à la reformation du complexe hétérotétramérique et donc à l'inhibition de l'activité catalytique de la PKA (Tasken et Aandahl 2004). Historiquement, par l'utilisation de la technique d'élution sur colonne chromatographique échangeuse d'ions, deux classes différentes de PKA ont été identifiées : PKAI et PKAII (Corbin et al. 1975). Ces deux types de PKA se différencient par leur sous-unités régulatrice nommées RI et RII, la première citée représentant l'activité majoritaire dans le ventricule de rat et de souris (Corbin et Keely 1977). La PKAI possède une constante d'association de 50 à 100 nM d'AMPc et est plutôt considérée comme cytoplasmique tandis que la PKAII présente une constante d'association de 200 à 400 nM et est considérée comme confinée dans des structures et compartiments subcellulaires (Corbin et al. 1977 ; Dostmann et Taylor 1991). Depuis, les connaissances sur les groupes des sous-unités R et C ont progressé et ceux-ci sont répartis comme suit : quatre sous-unités R (RI α , RI β , RII α , RII β) et quatre sous-unités C (C α , C β , C γ et PRKX pour *human X chromosome-encoded protein kinase X*) (Skalhegg et Tasken 2000). Pour chaque type de sous-unité, c'est la forme α (forme ubiquitaire) qui est en majorité retrouvée au niveau cardiaque (pour les sous-unités) (Shuntoh et al. 1992) même si les quatre isoformes de sous-unités R répertoriées à ce jour ont pu être identifiées dans le cœur (Scholten et al. 2007). Les sous-unités R possèdent toutes un domaine de dimérisation (*Dimerization/Docking Domain* (D/D)) en hélice à leur extrémité N-terminale qui permet la liaison de deux sous-unités R entre elles de façon antiparallèle. La dimérisation permet la formation d'une structure formée de quatre hélices qui s'entre chevauchent (structure en X) pour former une interface hydrophobe qui va interagir avec les protéines d'échafaudage assurant l'adressage subcellulaire de la PKA. Le domaine D/D est suivi par un site inhibiteur IS (*Inhibitor Sequence*) qui correspond au site de liaison de la sous-unité catalytique (C) au niveau de son site actif en absence d'AMPc, inhibant ainsi l'activité catalytique de l'enzyme. En région C-terminale, chaque sous-unité régulatrice possède deux domaines de fixation pour l'AMPc (A et B) hautement conservés. L'AMPc se fixe sur le domaine PBC (*Phospho-Binding Cassette*) avec une plus faible affinité pour le domaine A que le domaine B (Kim et al. 2005 ; Taylor et al. 2005 ; Kim et al. 2007). La PKA peut également être régulée par une famille de peptides, les PKI (*protein kinase inhibitor*) qui inhibent l'activité de la PKA indépendamment de l'AMPc en se liant à la sous-unité C (Walsh et al. 1971 ; Scott et al. 1985). Les PKI présentent ainsi un intérêt

comme outil pour l'étude des rôles de la PKA en tant qu'inhibiteurs de celle-ci (Lum et al. 1999). Il faut également noter qu'un stress oxydatif peut également inhiber l'activité de la PKA par glutathionylation du résidu Cystéine 199 des sous-unité C (Humphries et al. 2002).

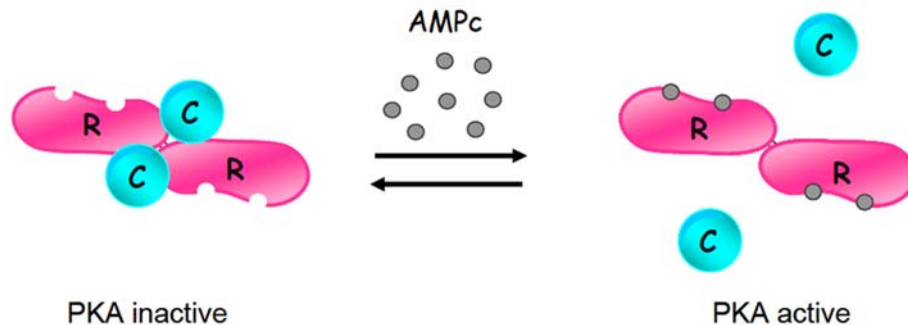


Figure 12 : Représentation schématique de la PKA et de son activation

La PKA est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). Elle est activée par la fixation de quatre molécules d'AMPc sur les sous-unités R qui induit la dissociation des sous unités C qui phosphorylent des résidus sérine et thréonine spécifiques sur les protéines cibles.

Il est cependant surprenant de remarquer que si c'est la PKAI qui est majoritairement exprimée au niveau cardiaque en particulier chez le rongeur (Corbin et Keely 1977), c'est la PKAII qui est prédominante dans la régulation du CEC cardiaque (Diviani et al. 2011). On peut donc se demander quel est le rôle de la PKAI dans le cardiomyocyte, une question qui fait l'objet d'un projet développé par G. Vandecasteele au sein du laboratoire.

b) Protéines associées : les AKAP

La localisation subcellulaire de la PKA joue également un rôle prépondérant dans le contrôle et la spécificité des effets induits par l'activation de la kinase. En effet, si la limitation de diffusion de l'AMPc dans le cytoplasme permet une compartimentation des signaux AMPc cellulaires, celle-ci implique une localisation de la PKA au plus près des protéines cibles effectrices à activer spécifiquement (pour revue : Dodge-Kafka et al. 2006). Cette localisation précise de la PKA est permise par l'ancrage des sous-unités régulatrices sur des protéines d'échafaudage : les AKAP (*A-kinase anchoring proteins*). Ces protéines, se fixent à l'extrémité N-terminale des sous-unités R de la PKA. Les différentes familles d'AKAP sont caractérisées par leur capacité à fixer la PKA, notons toutefois qu'en règle générale, les AKAP fixent la PKAII avec une haute affinité et la PKAI avec une affinité plus

basse. Les D-AKAP (*dual-AKAP*) sont impliquées dans l'ancrage de protéines à la fois à PKAI et à PKAII (Tasken et Aandahl 2004).

Sur plus de soixante-dix AKAP différentes obtenues à partir de l'épissage alternatif de quarante-trois gènes différents (Welch et al. 2010), treize familles d'AKAP semblent être exprimées dans le tissu cardiaque de rat (Ruehr et al. 2004). Plusieurs AKAP ont été montrées comme étant associées à des protéines intervenant dans la voie de signalisation β -AR et/ou le CEC (**Figure 13**). Ainsi, les AKAP79 (AKAP5) forment des complexes macromoléculaires au niveau des récepteurs β -AR en fixant à leur proximité les AC5/6 et des LTCC (Gao et al. 1997 ; Nichols et al. 2010), les mAKAP (AKAP6) sont présentes au niveau des AC5 (Kapiloff et al. 2009) et des RyR2 (Kapiloff et al. 2001) mais elles peuvent aussi fixer à la fois la CaN (ou PP2B) lorsqu'elle est active (liée au Ca^{2+}), son effecteur le facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) ainsi que la phosphodiesterase 4D3 (PDE4D3), une enzyme impliquée dans la dégradation de l'AMPc comme nous le verrons au chapitre II.C.1 (Dodge et al. 2001 ; Li et al. 2010). Les AKAP7 contrôlent également la régulation du CEC : les AKAP15/18 α (AKAP7 α) permettent de cibler la PKA au niveau du LTCC (Fraser et al. 1998 ; Hulme et al. 2003) et les AKAP18 δ ciblent la PKA à proximité de la SERCA2a et du PLB (Lygren et al. 2007). En outre, l'AKAP Yotiao (AKAP9) forme un complexe avec le canal KCNQ1 qui porte le courant repolarisant I_{Ks} (Marx et al. 2002).

Les AKAP permettent par conséquent d'obtenir un haut degré de spécificité de localisation ainsi qu'un contrôle spatial et temporel de la régulation de la signalisation PKA-dépendante en couplant les acteurs de la synthèse (les AC), de la fonction (la PKA et ses cibles) et de la dégradation (PDE) de l'AMPc (pour revue : Scott et al. 2013).

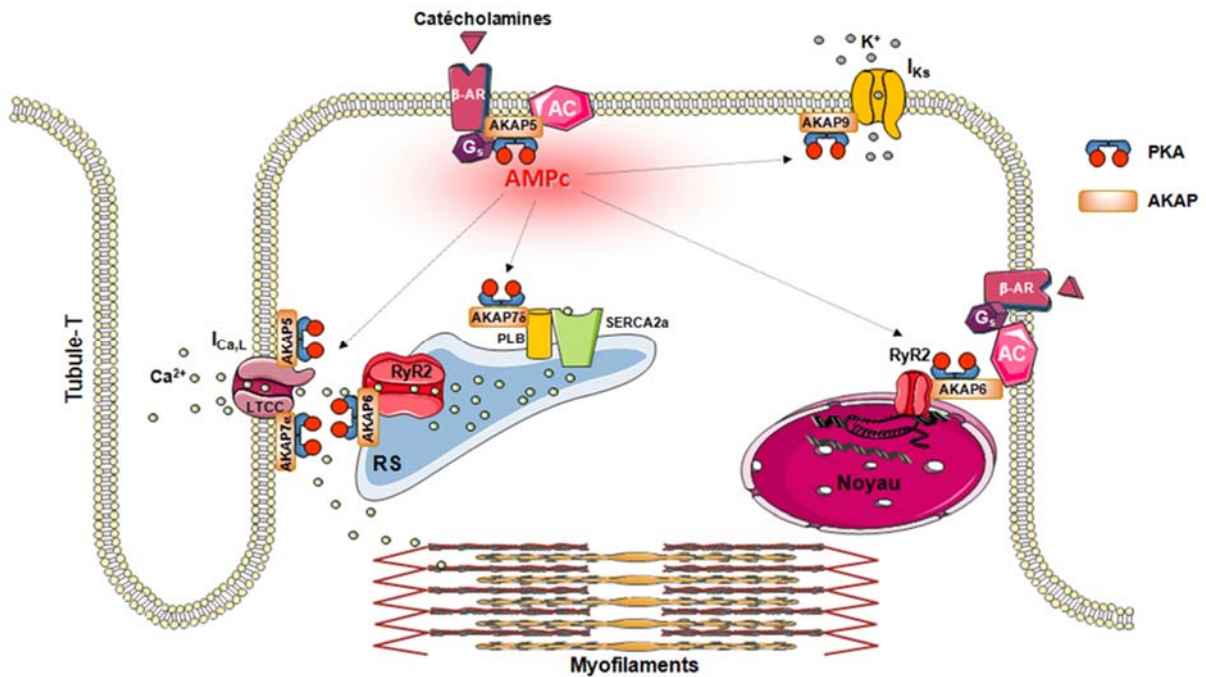


Figure 13 : Schéma des complexes PKA-AKAP majeurs associés à des protéines intervenant dans la voie de signalisation β -AR et/ou le CEC cardiaque

Les protéines d'échafaudage AKAP lient la PKA et une diversité d'autres protéines dont des protéines jouant un rôle majeur dans la voie de signalisation β -AR et/ou le CEC cardiaque. Cet arrangement moléculaire permet une activation locale et ciblée de ces protéines par la voie AMPc par leur phosphorylation.

c) Actions de la PKA sur ses cibles

La PKA est un maillon essentiel de la régulation β -AR de la fonction cardiaque. Par son action, elle permet la phosphorylation des protéines clefs du CEC permettant de réguler l'inotropie, et la lusitropie cardiaque au niveau ventriculaire, mais également la chronotropie par son action sur le courant ionique I_f au niveau atrial. Les protéines clefs du CEC ciblées par la PKA regroupent notamment les canaux Ca^{2+} (LTCC et RyR2), le PLB, les protéines contractiles (TnI et MyBP-C) et les PDE et les phosphatases (Bers 2002). Dans ce sous-chapitre seront décrits les principales cibles et effets associés d'une phosphorylation par la PKA, choisis pour leur lien avec la régulation de l'homéostasie calcique et du CEC cardiaque, cette description est donc non-exhaustive.

Comme précisé lors du chapitre I.A.2, la PKA contrôle le "déclencheur" du CEC dans le myocyte ventriculaire cardiaque : le LTCC. Par son action de phosphorylation du LTCC, la PKA entraîne une augmentation de l'amplitude du courant $I_{\text{Ca,L}}$. Les cause de cette potentialisation du courant calcique sont doubles : un déplacement des courbes d'activation et

d'inactivation vers des potentiels plus négatifs permettant à la fois un abaissement du seuil d'activation du courant Ca^{2+} de type L et une augmentation du courant de fenêtre, et une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal. Les sous-unités α_{1C} des canaux $\text{Cav}1.2$ comprennent six sites composés de résidus sérine potentiellement phosphorylables par la PKA (Ser 124, 1575, 1627, 1700, 1848 et 1928) (van der Heyden et al. 2005), mais leur utilité respective est à ce jour sujet à une forte controverse. Si dans un premier temps plusieurs études se sont accordées à dire que seul le site Ser 1928 est réellement phosphorylé par la PKA (De Jongh et al. 1996), d'autres études ont contredit cette hypothèse (Lemke et al. 2008) et ont montré que le site crucial pour une régulation de l'activité du canal par la PKA se situerait au niveau du résidu Ser 1700 (Fuller et al. 2010). Cette seconde hypothèse a cependant été de nouveau récemment contredite par le groupe de Marx (Yang et al. 2013) mais réaffirmée par le groupe de Catterall (Fu et al. 2014). Si l'on sait que cette régulation est possible grâce à la présence d'un domaine d'association de type leucine zipper à l'extrémité C terminale des canaux $\text{Cav}1.2$ qui permet une interaction entre la sous-unité α_{1C} et la PKA *via* AKAP7 α (Hulme et al. 2003), son implication dans l'augmentation du courant Ca^{2+} sous stimulation β -AR n'est donc toujours pas clairement établie. Ceci est d'autant plus vrai que la régulation β -AR de $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ est préservée dans des souris KO pour AKAP7 α (Jones et al. 2012).

La sous-unité β_2 constitue la seconde cible de la PKA potentiellement impliquée dans la régulation du LTCC (Haase et al. 1993). On y retrouve trois sites consensus pour la PKA : Ser 459, Ser 478 et Ser 479. Si dans un premier temps il avait été montré un rôle de modulateur du degré de phosphorylation de β_2 par la Ser 459 et que la phosphorylation des sites Ser 478 et Ser 479 jouait un rôle central dans l'action régulatrice de la sous-unité β_2 sur le canal en réponse à l'activation de la PKA (Bunemann et al. 1999 ; Gerhardstein et al. 1999 ; Kamp et Hell 2000), ces résultats ont été récemment contredits par une étude récente dans des souris *knock-in* (KI) présentant un clivage de l'extrémité C-terminale contenant les sites de phosphorylation (Brandmayr et al. 2012). Ainsi, la régulation β -AR de l'activité du LTCC n'est toujours pas connue avec précision et reste sujette à controverse.

Comme décrit plus tôt dans cette introduction, par sa liaison à une protéine d'échafaudage au niveau de son extrémité N-terminale, le RyR2 fait partie d'un complexe macromoléculaire. Celui-ci regroupe, autour de la mAKAP, d'autres protéines telles que des protéines régulatrices Ca^{2+} -dépendantes (calstabin 2, CaM), des phosphatases (PP1 et PP2A), des PDE et des protéines kinases parmi lesquelles la PKA (Lacampagne et al. 2008).

Il est bien établi que la Ser 2808 (Ser 2809 chez le lapin) constitue le principal résidu phosphorylé par la PKA (Huke et Bers 2008). Le groupe de A. Marks a montré que la phosphorylation de ce site entraîne la dissociation de la protéine calstabin 2 (également appelée FKBP12.6) stabilisatrice de l'état fermé du canal (Timmerman et al. 1994). Cette phosphorylation active le RyR2 en augmentant sa probabilité d'ouverture et sa sensibilité au Ca^{2+} potentialisant ainsi la libération de Ca^{2+} par le RS ce qui permet un renforcement de l'inotropisme cardiaque (Kaftan et al. 1996) (voir chapitre I.B.3). Ces effets liés à la phosphorylation du RyR2 par la PKA, qui sont controversés (Eschenhagen 2010), sont contrebalancés par l'action antagoniste des phosphatases (PP1 et PP2A) liées au RyR2 par des protéines d'échafaudage distinctes (la spinophiline et la PR130 respectivement) et qui déphosphorylent le récepteur de la ryanodine (Marx et al. 2000).

L'activité de la SERCA2a peut également être modulée sous l'action de la PKA, mais indirectement. Le site de phosphorylation PKA-dépendant régulant l'activité de la SERCA2a se situe au niveau de la Ser 16 du PLB, une protéine associée à la SERCA2a au niveau du RS (Tada et al. 1975). Cette phosphorylation entraîne une dissociation de la SERCA2a avec son inhibiteur constitutif, le PLB, levant ainsi l'action inhibitrice de celui-ci (Kirchberger et al. 1972 ; Marx et al. 2001). Cette régulation de l'activité de repompage du Ca^{2+} dans le RS est très importante dans les effets lusitrope et inotrope positifs de la PKA. En effet, l'accélération du recapture de Ca^{2+} par la SERCA2a permet non-seulement de reformer les réserves de calcium du RS pour les rendre disponibles plus rapidement afin de faire face à l'augmentation de la fréquence des contractions cardiaques observée lors d'une stimulation β -AR (effet chronotrope positif), mais aussi d'augmenter les réserves intracellulaires de Ca^{2+} et donc d'augmenter le Ca^{2+} disponible pour activer les protéines contractiles et permettre l'effet inotrope positif d'une stimulation β -AR (Trafford et al. 2001).

Toujours au niveau des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique, la régulation par la PKA du NCX, principal acteur de la sortie de Ca^{2+} du myocyte et acteur majeur de la régulations des niveaux de Ca^{2+} intracellulaires, est sujette à controverse : si plusieurs études ont montré une action de la PKA sur l'activité du NCX (Perchenet et al. 2000 ; Wei et al. 2002 ; Reppel et al. 2007 ; Chase et Orchard 2011) d'autres études ont pour leur part montré qu'une stimulation β -AR ne modifiait pas son activité (Ballard et Schaffer 1996 ; Main et al. 1997 ; Ginsburg et Bers 2005 ; Lin et al. 2006 ; Wanichawan et al. 2011 ; pour revues : Zhang et Hancox 2009 ; Morad et al. 2011).

Comme cité précédemment, la PMCA possède des sites de phosphorylation au niveau C-terminal, dont un résidu Ser spécifique d'une phosphorylation par la PKA (James et al. 1989). Cependant, cette phosphorylation par la PKA est discutée du fait de l'existence de certaines études qui indiquent que la PMCA n'est pas phosphorylée par la PKA (Chase et Orchard 2011).

Parmi les protéines qui composent les myofilaments, la TnI, la MyBP-C et la titine admettent une régulation PKA-dépendante. La phosphorylation de la TnI par la PKA, à son extrémité N-terminale au niveau des résidus Ser 23 et Ser 24 chez l'Homme et le rat (Swiderek et al. 1988 ; Mittmann et al. 1990) (Ser 22 et Ser 23 chez la souris), provoque une diminution de l'affinité de la TnC pour le Ca^{2+} et une accélération de la cinétique de relaxation cellulaire (lusitropisme) lors d'une stimulation β -AR (Layland et al. 2005). La MyBP-C possède pour sa part trois sites potentiels de phosphorylation par la PKA (entre autres protéines kinases) en région N-terminale : Ser 273, Ser 282 et Ser 302 (Mohamed et al. 1998). La phosphorylation du résidu Ser 282 est un pré-requis pour la phosphorylation des deux autres résidus. Des études récentes ont mis en évidence les sites phosphorylés par la PKA chez le chien (Ser 279, Ser 288, Ser 290, Ser 308, Ser 313 et Ser 331) (Yuan et al. 2006). Si la phosphorylation de la MyBP-C par la PKA n'influence pas directement la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} (Sadayappan et al. 2009), elle est directement impliquée dans l'interaction entre les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine, dans le développement de la force maximale et dans la régulation de la cinétique d'attachement-détachement des ponts actine-myosine (Barefield et Sadayappan 2010). Le degré de phosphorylation de la MyBP-C semble donc être en corrélation avec la vitesse de relaxation et de cyclage des ponts actine-myosine possiblement en provoquant le déplacement de la tête de myosine vers les filaments fins (Winegrad 1999). Enfin, il a été montré que la PKA phosphoryle l'élément N2B de la titine, diminuant ainsi la rigidité cellulaire ce qui permet une meilleure adaptabilité de la cavité cardiaque à changer de volume en fonction de la pression exercée par le sang sur ses parois (notion de compliance du cœur) (Yamasaki et al. 2002 ; pour revue : Granzier et Labeit 2004).

La PKA peut aussi réguler l'activité des β -AR lors de leur activation prolongée par désensibilisation hétérologue où elle phosphoryle directement les β -AR pour réduire leur activité (Hausdorff et al. 1989 ; Lohse et al. 1990), mais aussi en favorisant la désensibilisation homologue des β -AR liée à la GRK2 : la phosphorylation directe par la PKA des protéines GRK2 sur leur résidu Ser 685 augmente l'affinité des GRK2 pour les

sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G permettant ainsi de renforcer les capacités de la GRK2 à être transloquée vers la membrane où elle phosphoryle les β -AR (Cong et al. 2001).

Les effecteurs directs des β -AR sont aussi régulés par la PKA : les AC 5 et 6, isoformes majoritaires dans le cœur, sont phosphorylées par la PKA sur leur site Ser 676 et Ser 674 respectivement ce qui entraîne une diminution de l'activité de ces AC et donc une diminution de la production d'AMPc (Bauman et al. 2006).

L'activité de certaines PDE est aussi régulée par la PKA (familles 1, 3, 4 et 10, voir : Conti et Beavo 2007), nous décrirons cette régulation plus tard.

En outre, la PKA peut influencer le CEC de manière indirecte, par phosphorylation de protéines jouant le rôle d'intermédiaire entre la PKA et les protéines régulatrices du CEC comme dans le cas du PLB pour la SERCA2a. Par exemple, la protéine Ahnak qui interagit avec la sous-unité β_2 du LTCC est un substrat de la PKA, il a été proposé que suite à une stimulation β -AR, celle-ci phosphoryle le domaine C-terminal de la protéine ahnak ce qui lève son action inhibitrice sur le canal et permet ainsi de potentialiser le courant $I_{Ca,L}$ (Haase et al. 2005 ; pour revue : Haase 2007).

Enfin, la PKA est également impliquée dans la régulation du couplage excitation-transcription (CET) lui permettant d'influer ainsi à plus long terme sur la morphologie et le fonctionnement des cardiomyocytes en modulant l'activité de protéines contrôlant l'expression de gènes telle la protéine CREB (*cAMP responsive element binding protein*), CREM (*cAMP responsive element binding modulator*) ou les histones déacétylases (HDAC) (Sands et Palmer 2008). Par exemple, une phosphorylation directe de CREB par la PKA sur son résidu Ser 133 (Gonzalez et Montminy 1989) permet d'activer la transcription de gènes contrôlés par l'élément de réponse CRE (*cAMP responsive element*) (Lefkimmatis et Zaccolo 2014). La PKA joue également un rôle dans la répression du facteur pro-hypertrophique MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) de manière indirecte par induction d'un clivage de HDAC4 qui libère un fragment N-terminal qui inhibe l'expression de MEF2 (Backs et al. 2011) ou de manière directe par son action de phosphorylation du résidu Ser 280 de HDAC5 qui empêche son export vers le cytosol et permet là-encore de maintenir la répression de MEF2 (Ha et al. 2010).

2. Le facteur d'échange des petites protéines G (Epac)

En 1998, une nouvelle cible de l'AMPc est isolée simultanément par deux groupes et nommée Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) par le groupe de Johannes Bos (de Rooij et al. 1998 ; Kawasaki et al. 1998). Les nombreuses études dont elle a depuis été l'objet ont permis de mettre en évidence son implication dans le fonctionnement de nombreux types cellulaires (Metrich et al. 2010 ; Breckler et al. 2011 ; Laurent et al. 2012 ; Almahariq et al. 2014) et notamment dans les cellules ventriculaires cardiaques que nous allons développer ci-dessous.

a) Structure et régulation d'Epac

Epac est un facteur d'échange du GTP qui catalyse l'échange du GDP pour du GTP sur les petites protéines G Rap1 et Rap2. L'activation d'Epac permet de potentialiser l'activation des petites protéines G en augmentant leur cinétique d'échange du GDP (état inactif) contre du GTP (état actif). Les protéines Epac sont codées par deux gènes, *RAPGEF3* et *RAPGEF4*, qui conduisent à la production de deux isoformes principales, Epac1 et Epac2 (**Figure 14.a**). La première est exprimée de façon ubiquitaire, tandis que la seconde, qui comprend une forme longue et une forme tronquée, nommées respectivement Epac2A et Epac2B, est plutôt exprimée au niveau cérébral, dans la glande hypophysaire et les surrénales (Metrich et al. 2010). Epac1 et 2 comprennent un domaine catalytique à l'extrémité C-terminale placé sous le contrôle d'un domaine régulateur situé à l'extrémité N-terminale. Le domaine régulateur contient un domaine d'adressage intracellulaire DEP (*Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin*) nécessaire à la translocation d'Epac vers le sarcolemme et permettant son association à la membrane, ainsi qu'un domaine CNB-B de liaison à l'AMPc (*cyclic nucleotide binding domain B*) à haute affinité (de Rooij et al. 2000 ; Qiao et al. 2002). L'isoforme Epac2A possède un deuxième site de liaison à l'AMPc (CNB-A) de plus faible affinité (Rehmann et al. 2008). Le domaine catalytique est pour sa part composé d'un domaine homologue CDC25 portant l'activité d'échange de nucléotides, lui-même stabilisé par un domaine REM (*Ras exchange motif*) par la formation d'un pont intramoléculaire entre les régions régulatrice et catalytique, et un domaine d'association avec Ras (RA) (Rehmann et al. 2006). La fixation d'AMPc au niveau du domaine CNB-B induit un important changement de conformation d'Epac qui libère la région catalytique de son interaction avec la région régulatrice (**Figure 14.b**) (Rehmann et al. 2008) permettant à Epac d'activer Rap.

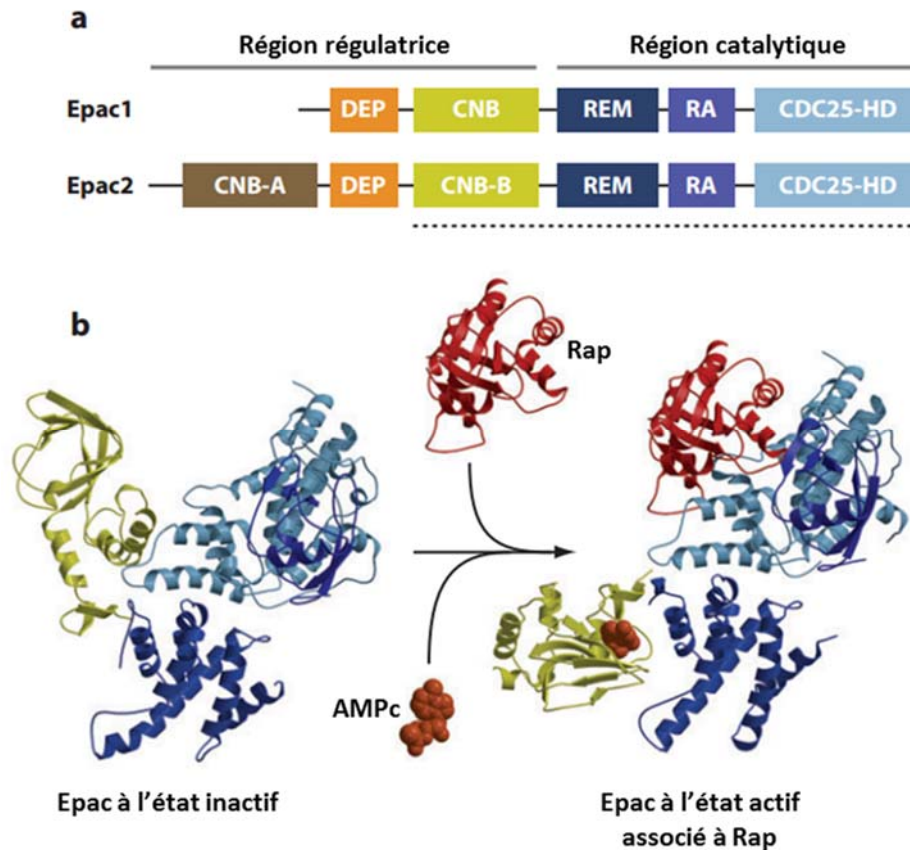


Figure 14 : Représentation de la structure et de l'activation des protéines Epac

a : Organisation structurale des protéines Epac1 et Epac2. DEP : domaine d'adressage intracellulaire *Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin*, CNB : Domaine de liaison aux nucléotides cycliques (*cyclic nucleotide binding domain*), REM : domaine stabilisateur d'Epac (*Ras exchange motif*), RA : domaine d'association d'Epac avec Ras (*Ras association domain*), CDC25HD : domaine d'homologie (*CDC25-homology domain*). **b** : Mécanisme d'activation des protéines Epac. Structure de la forme inactive et active d'Epac2 en complexe avec la protéine Rap et l'AMPc. (adapté de Gloerich et Bos 2010)

b) Action d'Epac dans le cœur

De nombreuses études ont permis de montrer la présence d'Epac dans le cardiomyocyte (Morel et al. 2005 ; Oestreich et al. 2007 ; Pereira et al. 2007) où il y est exprimé à la fois dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique (Pereira et al. 2015). Comme pour la PKA, la localisation subcellulaire d'Epac ainsi que les protéines associées présentes dans les complexes macromoléculaires contenant Epac vont déterminer les effets de l'activation d'Epac. Comme décrit précédemment, une stimulation β -AR conduit à une augmentation des niveaux d'AMPc cytoplasmiques. La stimulation β -AR suffit donc à déclencher l'activation d'Epac. De nombreuses études ont alors cherché à déterminer les effets d'une activation

d'Epac sur le CEC, le CET (couplage excitation-transcription) et l'homéostasie calcique cellulaire (Metrich et al. 2010).

En 2007, deux études complémentaires ont démontré un rôle d'Epac dans le contrôle du CEC cardiaque (Oestreich et al. 2007 ; Pereira et al. 2007). Ces études montrent qu'une activation d'Epac, directe (Pereira et al. 2007) ou lors d'une stimulation β -AR (Oestreich et al. 2007), augmente la libération des réserves de Ca^{2+} contenues dans le RS par une voie de signalisation impliquant la petite protéine G Rap, la phospholipase C de type ϵ (PLC ϵ), et la CaMKII. L'activation de la CaMKII phosphoryle le RyR2 sur son site spécifique pour en augmenter son activité (Oestreich et al. 2009) (**Figure 15**). Ces deux études montrent toutefois des effets opposés de l'activation d'Epac sur l'amplitude des transitoires Ca^{2+} , et soulignent l'effet délétère d'une activation prolongée de cette voie : si la fuite de Ca^{2+} du RS sous forme d'étincelles (*sparks*) calciques perdure, ceci conduit à une vidange du RS et donc à une diminution de la quantité de Ca^{2+} mobilisable à l'origine d'une diminution des transitoires calciques observée par (Pereira et al. en 2007) et explique la variabilité des résultats décrits dans la littérature à ce sujet en fonction de la durée d'activation d'Epac (Ruiz-Hurtado et al. 2013). Ce schéma de régulation de l'homéostasie calcique est conforté par le fait que l'activation d'Epac ne semble avoir d'influence majeure ni sur le courant I_{CaL} (Pereira et al. 2007 ; Oestreich et al. 2009), ni sur l'activité de la SERCA2a (Oestreich et al. 2007 ; Pereira et al. 2007) malgré l'augmentation du degré de phosphorylation de la Thr 17 du PLB (Oestreich et al. 2009). Ceci va dans le sens d'une déplétion en Ca^{2+} du RS du fait d'une sortie de Ca^{2+} augmentée sans augmentation compensatoire du repompage de Ca^{2+} par la SERCA2a. Cette absence d'influence majeure d'Epac sur l'activité de la SERCA2a a cependant été récemment remise en cause par une étude réalisée sur des souris déficientes pour le gène codant pour Epac1 (Okumura et al. 2014). Ces animaux présentent une diminution significative du degré de phosphorylation sur la Ser 16 du PLB associée à une contractilité cardiaque réduite.

Si Pereira et al. ont montré une diminution de l'amplitude des transitoires calciques lors d'une activation d'Epac, celle-ci ne s'accompagnait étonnamment pas d'une diminution de la contraction cellulaire (Pereira et al. 2007). Ce maintien de l'amplitude de la contraction a depuis été expliqué par une augmentation Epac-dépendante de la sensibilité au Ca^{2+} des myofilaments due à la phosphorylation de la TnI et de la MyBP-C (Cazorla et al. 2009). Epac régule donc le CEC lors d'une stimulation β -AR aigüe principalement en favorisant la libération des réserves Ca^{2+} du RS et en augmentant la sensibilité des myofilaments. Nous

pouvons également ajouter dans ce paragraphe deux études montrant la régulation par Epac d'une autre famille de protéines jouant un rôle dans le fonctionnement du syncytium cardiaque : les connexines (Cx) qui s'associent pour former des jonctions communicantes (*gap-junctions*) qui permettent le passage direct d'électrolytes (tel le Ca^{2+}) et de petites molécules (tel l'AMPc) d'une taille inférieure à 1,5 kDa entre cellules voisines (pour revue : Jansen et al. 2010). Ces études ont montré qu'une activation d'Epac favorise l'expression à la membrane et la phosphorylation par PKC de la Cx43, l'isoforme majoritairement exprimée dans le cœur (Somekawa et al. 2005 ; Duquesnes et al. 2010) (**Figure 15**).

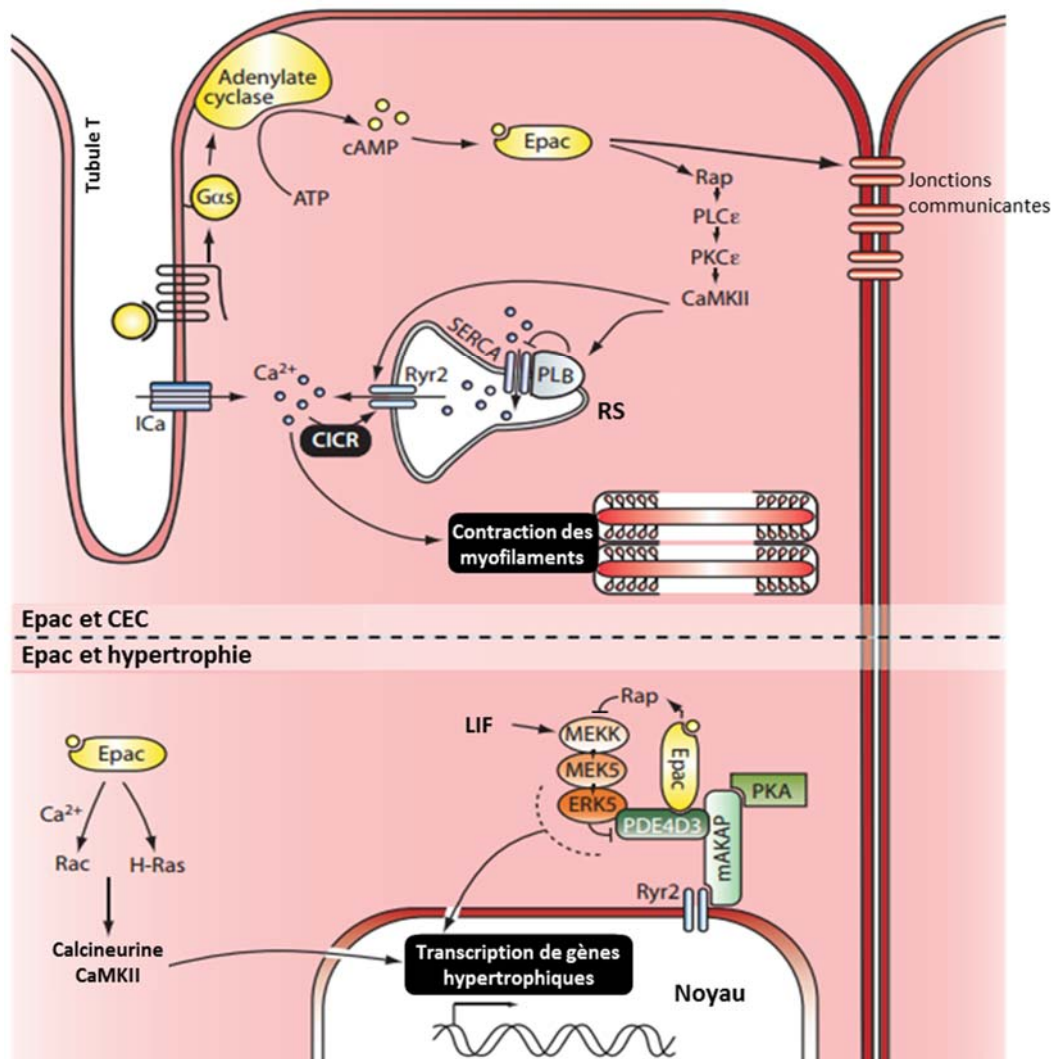


Figure 15 : Schéma des effets cardiaques d'Epac

Epac potentialise le cycle de Ca^{2+} et la contraction (haut) et module la transcription de gènes pro-hypertrophiques (bas). PLC ϵ : phospholipase C ϵ , PKC ϵ : protéine kinase C ϵ , CaMKII : Ca^{2+} /calmoduline kinase II, RS : réticulum sarcoplasmique, PLB : phospholamban, SERCA : pompe Ca^{2+} du RS, CICR : relargage de Ca^{2+} induit par le Ca^{2+} , ERK5 : *extracellular signal-regulated kinase 5*, LIF : leukemia-induced factor, MEK5 : *mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated protein kinase kinase 5*; MEKK : *MEK kinase*. (adapté de Gloerich et Bos 2010)

Mais Epac influence également le CEC lors d'une stimulation β -AR chronique. Une activation prolongée d'Epac par administration *in vivo* d'une forme non-hydrolysable de son activateur spécifique (Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) entraîne à la fois une augmentation des transitoires Ca^{2+} et de la contraction cellulaire (Ruiz-Hurtado et al. 2012). Ces résultats, différents de ceux observés lors d'une activation aiguë d'Epac, montrent une augmentation du courant $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ de fenêtre, un ralentissement de l'expulsion de Ca^{2+} hors de la cellule et une accélération du repompage du Ca^{2+} dans le RS permettant ainsi d'augmenter à la fois le "déclencheur" du CEC et les quantités de Ca^{2+} mobilisables pour induire la contraction. Ces effets ont pu être reliés à l'activation d'une voie de signalisation faisant intervenir la CaM qui joue le rôle de senseur de Ca^{2+} , la calcineurine (CaN ou PP2B) et la CaMKII (Ruiz-Hurtado et al. 2013).

La CaN et la CaMKII sont toutes les deux activées par le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et sont connues pour activer la transcription de gènes pro-hypertrophiques. La CaN, une fois activée, déphosphoryle le facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) au niveau du cytoplasme, ce qui entraîne sa translocation vers le compartiment nucléaire où il se fixe sur l'ADN-cible pour induire la transcription de gènes pro-hypertrophiques (Shibasaki et al. 1996). La CaMKII activée phosphoryle pour sa part HDAC4 et HDAC5 qui sont alors exportés du noyau vers le cytoplasme levant ainsi leur effet répresseur sur le facteur de transcription MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) (Backs et al. 2006 ; Backs et al. 2008) ce qui entraîne là-encore l'expression de gènes pro-hypertrophiques (Bisserier et al. 2014). Ce lien entre Epac et hypertrophie, montré pour la première fois en 2005 sur cardiomyocytes néonataux (Morel et al. 2005) puis adultes (Metrich et al. 2008), a pu être relié à l'activation de l'isoforme Epac1 localisée dans un complexe macromoléculaire comprenant la β -arrestine2 qui permet son adressage au niveau des récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR (Berthouze-Duquesnes et al. 2013). Il faut toutefois noter l'implication d'Epac1 dans un mécanisme cellulaire anti-hypertrophique mis en évidence dans des cardiomyocytes néonataux de rat faisant intervenir la PKA, une PDE et la protéine ERK5 (*extracellular signal-regulated kinase 5*) regroupés dans un complexe macromoléculaire autour de la mAKAP. Lors de l'activation d'Epac1 par une augmentation de la concentration en AMPc au niveau du microdomaine contenant la mAKAP, l'activation de la petite protéine G Rap1 entraîne l'inhibition d'ERK5 qui est un acteur de la voie de signalisation pro-hypertrophique induite par LIF (*leukemia-induced factor*) et conduit également à l'augmentation de la dégradation de

l'AMPC par la PDE située au niveau du complexe moléculaire (Dodge-Kafka et al. 2005) (**Figure 15**).

Si Epac régule le CEC (principalement *via* Epac2, (Pereira et al. 2013)), ce facteur d'échange joue également, à plus long terme, un rôle important dans la régulation du CET (Pereira et al. 2012), principalement *via* Epac1 (Berthouze-Duquesnes et al. 2013), et dans le développement de l'hypertrophie cardiaque maladaptative qui peut se dégrader en IC. Ces effets différents entre les deux isoformes d'Epac peuvent être corrélés à leur localisation intracellulaire qui a été définie il y a quelques mois : Epac1 est plutôt localisé et fonctionnellement impliqué dans la signalisation au niveau nucléaire, tandis que Epac 2 est principalement localisé au niveau des tubules-T où il y régule la fuite de Ca^{2+} du RS qui a un rôle pro-arythmique (Pereira et al. 2015).

3. Canaux HCN

Les canaux HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated channels*) sont des canaux ioniques voltage-dépendants, activés par l'hyperpolarisation et responsables du courant pacemaker I_f des cellules nodales. Cette famille de canaux regroupe quatre isoformes nommées HCN1 à HCN4 et admettant des taux d'expression variables selon les tissus. Les isoformes HCN1, HCN2 et HCN4 sont toutes les trois exprimées au niveau cardiaque (Baruscotti et al. 2005). HCN4 est majoritairement exprimé au niveau du nœud sinusal et des fibres de Purkinje où son degré d'expression corrèle avec l'activité spontanée caractéristique des cellules cardiaques automatiques (Mangoni et Nargeot 2008). HCN2 est l'isoforme majoritairement exprimée au niveau atrial (El Chemaly et al. 2007) ainsi que dans le tissu ventriculaire où son expression reste tout de même faible dans le cœur sain comparée aux tissus conducteurs (Kuwabara et al. 2013). Les canaux HCN sont sensibles à l'AMPC. En l'absence d'AMPC, l'extrémité C-terminale cytoplasmique du canal inhibe son activité. L'AMPC active le courant I_f par un mécanisme direct en interagissant avec l'extrémité C-terminale du canal. Ce mécanisme d'activation provoque un décalage de la courbe d'activation du canal vers des potentiels membranaires plus positifs ce qui correspond à étendre la gamme de potentiels pour lesquels les canaux peuvent être activés (DiFrancesco et Tortora 1991). Si l'existence de ce mécanisme indépendant de la phosphorylation du canal a été confirmée par l'utilisation d'un analogue de l'AMPC n'activant pas la PKA (Rp-cAMP)

(Bois et al. 1997), il a cependant été montré que l'activité des canaux HCN est également augmentée par un mécanisme dépendant de la PKA (Chang et al. 1991). Dans la structure du canal HCN4 on dénombre seize sites pouvant être phosphorylés par la PKA avec trois sites situés à l'extrémité N-terminale (Ser 14, Ser 99 et Ser 110) et treize sites situés à l'extrémité C-terminale (Ser 719, Ser 831, Ser 918, Ser 1005, Ser 1011, Ser 1051, Thr 1071, Ser 1112, Ser 1128, Thr 1153, Ser 1154, Ser 1155 et Ser 1157). Le groupe distal composé de Thr 1153, Ser 1154, Ser 1155 et Ser 1157 semble être indispensable pour la régulation du canal par la PKA (Liao et al. 2010).

C. Mécanismes de terminaison des signaux AMPc dans le cœur

Plusieurs mécanismes de régulation sont mis en jeu afin de limiter dans le temps et dans l'espace les signaux AMPc qui apparaissent être délétères à long terme. En plus de la désensibilisation des récepteurs (abordée dans le chapitre II.A.1.c) ou de l'action des phosphatases qui déphosphorylent les protéines clés du CEC (non-détaillé ici, pour revue voir : Heijman et al. 2013), la terminaison des signaux AMPc s'effectue par action directe sur le second messenger intracellulaire. Deux mécanismes coexistent, l'un majeur consiste en la dégradation enzymatique sous l'action des phosphodiesterases des nucléotides cycliques (PDE) et l'autre moins important consiste en l'efflux en dehors de la cellule *via* des transporteurs d'efflux actifs appelés MRP (pour *multidrug resistance-associated proteins*). Ce mécanisme d'efflux de nucléotides cycliques a été observé pour la première fois dans les années 1960 (Davoren et Sutherland 1963) mais n'a été clairement identifié par la découverte du gène correspondant que trente ans plus tard (Cole et al. 1992) et ne sera décrit ici que de manière succincte car ne participant que faiblement en comparaison avec les PDE. Les MRP appartiennent à la vaste famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) et sont impliqués dans l'efflux de nombreux éléments hors des différents types cellulaires. L'extrusion de nucléotides cycliques par les MRP admet plusieurs propriétés : il s'agit d'un flux unidirectionnel dirigé vers l'extérieur de la cellule, ce flux est saturable et est inhibé lors d'une déplétion de l'ATP cellulaire (pour revue : Cheepala et al. 2013). Dans le cœur, l'efflux actif de l'AMPc est sous le contrôle de deux isoformes principales : les MRP4 (Sassi et al. 2012) et les MRP5 (Dazert et al. 2003). Les MRP4, qui constituent la famille prédominante, ont ainsi pu être reliées dans les cardiomyocytes de souris à un rôle dans la régulation de

l'homéostasie de l'AMPc intracellulaire, la contractilité cardiaque, et la régulation du développement de l'hypertrophie cardiaque dépendante du vieillissement (Sassi et al. 2012).

1. Phosphodiesterases des nucléotides cycliques (PDE)

Les phosphodiesterases (PDE) sont une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison ester située entre le carbone 3' du ribose et le phosphate de l'AMPc et/ou du GMPc, produisant un nucléotide 5'-phosphate (5'AMP ou 5'GMP) inactif. Cette réaction ne nécessite pas de dépense d'énergie ce qui permet une dégradation rapide de l'AMPc et à la modulation spatiale et temporelle de ce second messenger (Scott et Pawson 2009).

On dénombre à ce jour onze familles de PDE chez les mammifères qui sont codées par vingt-et-un gènes, avec environ cent isoformes différentes classifiées selon leur séquence peptidique, leurs cinétiques de dégradation des nucléotides cycliques, et les régulations dont elles sont l'objet (Guellich et al. 2014) (**Figure 16**). Toutes ces isoformes sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique situé à l'extrémité C-terminale et d'un domaine régulateur situé à l'extrémité N-terminale. Les domaines catalytiques des différentes PDE présentent au minimum 20% d'homologie de séquence peptidique, tandis que les domaines régulateurs diffèrent tous d'une PDE à l'autre. Ces domaines régulateurs contiennent, selon les isoformes, des domaines de dimérisation, des domaines de liaison à d'autres protéines régulatrices (CaM), des sites de phosphorylation (cibles de la PKA, la PKG ou la CaMKII), ou des domaines d'association à la membrane (pour revue : Conti et Beavo 2007). La diversité des domaines catalytiques permet pour sa part une diversité d'action entre les différentes familles de PDE en terme d'affinité pour les substrats, avec des PDE qui hydrolysent spécifiquement l'AMPc (PDE4, 7 et 8), d'autres qui sont spécifiques pour le GMPc (PDE5, 6 et 9), et enfin des familles qui hydrolysent à la fois l'AMPc et le GMPc (PDE1, 2, 3, 10 et 11) (pour revue : Keravis et Lugnier 2012). Dans le cœur, on recense actuellement huit familles de PDE : les PDE1 à 5 qui sont les mieux étudiées car les plus représentées, les PDE7 (Gardner et al. 2000 ; Johnson et al. 2012) et PDE8 pour lesquelles l'absence d'inhibiteur spécifique a dans un premier temps limité l'étude (Han et al. 1997 ; Patrucco et al. 2010), auxquelles il faut ajouter les PDE9 dont l'expression cardiaque vient d'être démontrée par le groupe de David Kass (Lee et al. 2015).

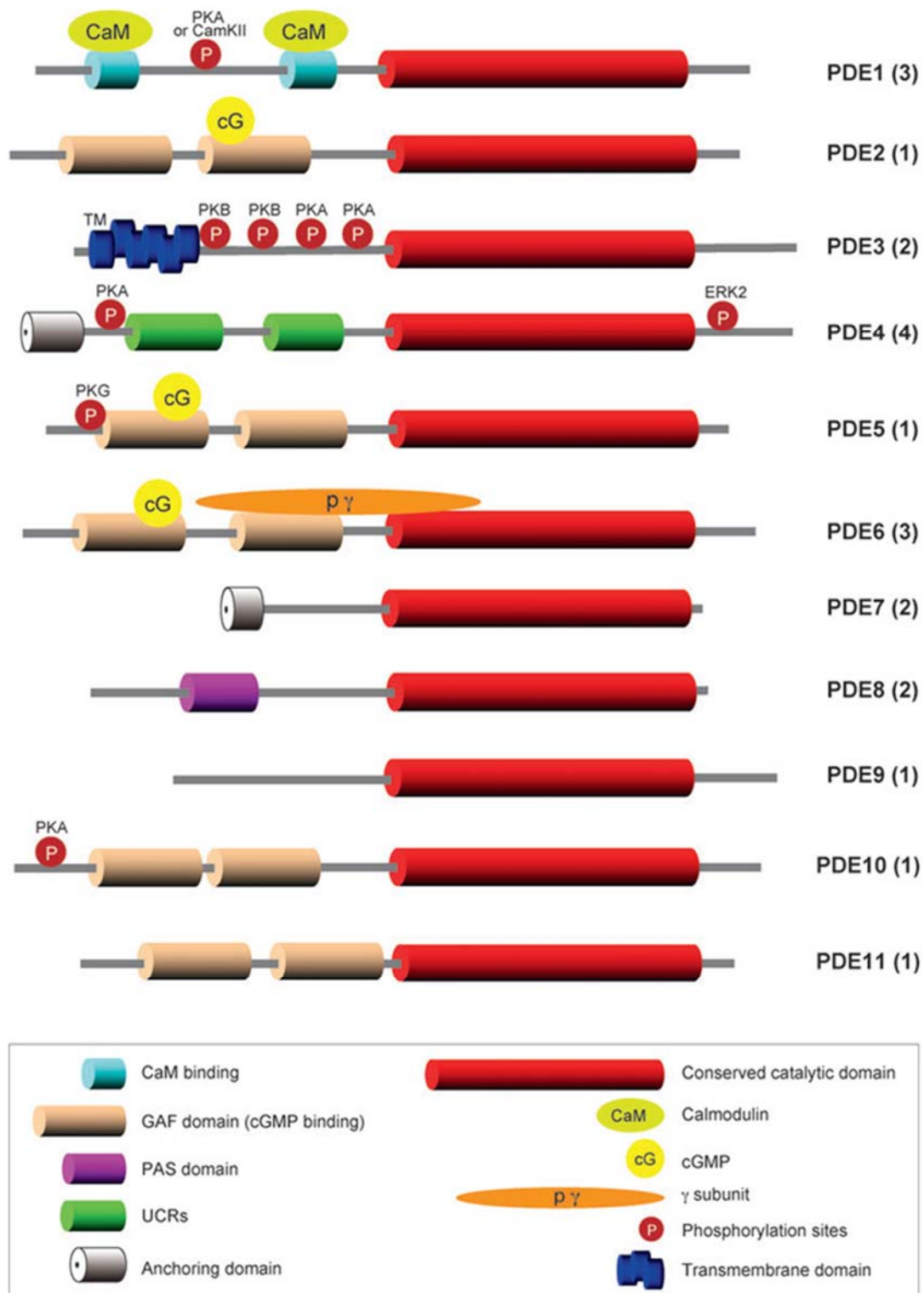


Figure 16 : Structures schématiques des onze familles de phosphodiéstérases (PDE)

Dans la moitié C-terminale de toutes les PDEs, le domaine catalytique conservé (rouge) présente au minimum 20% d'homologie de séquence en acides aminés d'une famille à une autre. Les onze familles se distinguent par leur domaine régulateur N-terminal. A droite de chaque structure apparaît le nom de la famille de PDE, le nombre de gènes correspondants est indiqué entre parenthèses. (D'après Conti et Beavo 2007)

2. Compartimentation spatiale des PDE dégradant l'AMPc dans le myocyte cardiaque

La notion de compartimentation des signaux dans les myocytes cardiaques a d'abord été suspectée car l'activation de récepteurs différents conduit à des augmentations des niveaux d'AMPc intracellulaires comparables, mais aboutit à des effets différents sur des cœurs isolés perfusés (Corbin et Keely 1977 ; Keely 1979). Ceci a été relié à l'activation sélective de deux types de PKA, l'une associée à la fraction cellulaire soluble (PKAI), et l'autre associée à la fraction cellulaire particulaire (PKAII) (Corbin et al. 1977). Plus tard, des expériences réalisées sur des myocytes ventriculaires de grenouille ont montré qu'une stimulation locale des récepteurs β -AR conduit à l'activation locale des LTCC. Cette activation locale est levée par l'application d'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine), un inhibiteur non-sélectif des PDE, ce qui a ainsi permis de montrer le rôle des PDE dans la compartimentation des signaux AMPc dans le cardiomyocyte (Jurevicius et Fischmeister 1996).

Si l'on se limite aux PDE qui dégradent l'AMPc, on dénombre quatre familles principales au niveau cardiaque : les PDE1, les PDE2, les PDE3 et les PDE4 (Conti et Beavo 2007) auxquelles il convient d'ajouter la PDE8A dont une étude a montré l'implication dans la régulation du CEC de cœurs de souris (Patrucco et al. 2010). Il est cependant important de noter que la présence et la répartition des différentes familles et isoformes de PDE varient d'une espèce à l'autre (Richter et al. 2011 ; Johnson et al. 2012 ; pour revue : Osadchii 2007), mais également à l'intérieur d'une même espèce en fonction de l'âge (Moses et al. 1987 ; Picq et al. 1995) ou du sexe (Parks et al. 2014). C'est la localisation coordonnée des PDE avec les AC productrices d'AMPc et à proximité des compartiments cellulaires à réguler, notamment grâce aux AKAP, qui va permettre une compartimentation adaptée et efficace des signaux AMPc.

a) PDE1

La famille des PDE1 correspond à la première famille de PDE mise en évidence (Cheung 1970 ; Kakiuchi et Yamazaki 1970). Sa présence au niveau cardiaque a depuis été confirmée (Richter et al. 2011). On dénombre trois isoformes A, B et C qui sont issues de trois gènes différents, mais plusieurs variants d'épissage existent pour chaque isoforme. Chez l'Homme, l'activité d'hydrolyse de l'AMPc par les PDE1 est assurée par la PDE1C (Vandeput

et al. 2007) qui dégrade à la fois l'AMPc et le GMPc contrairement aux deux autres isoformes qui dégradent préférentiellement le GMPc. Cette étude a également montré dans des homogénats de cœur que l'activité majeure de dégradation de l'AMPc par la PDE1C a lieu dans la fraction soluble, suggérant que cette enzyme est cytosolique. Les PDE1 sont les seules PDE régulées par le Ca^{2+} via le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Huang et al. 1981) : une fixation de ce complexe sur les deux sites de fixation situés à l'extrémité N-terminale de l'enzyme active la PDE1 en augmentant la vitesse de dégradation des nucléotides cycliques (Sonnenburg et al. 1995). Il existe un mécanisme de rétrocontrôle négatif à cette activation avec la possibilité d'une phosphorylation de la PDE1 par les protéines kinases PKA et CaMKII sur deux sites du domaine régulateur N-terminal qui diminue l'affinité de la PDE1 pour le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Sharma et Wang 1985 ; Hashimoto et al. 1989). Cependant, l'absence de commercialisation d'inhibiteurs spécifiques des PDE1 est à l'origine du faible degré de connaissance des rôles joués par la PDE1 au niveau cardiaque (pour revue : Guellich et al. 2014).

b) PDE2

Les PDE2 ont d'abord été mises en évidence dans le foie de rat (Beavo et al. 1971). Elles sont codées par un seul gène *PDE2A* dont l'épissage génère trois variants : *PDE2A1*, *PDE2A2* et *PDE2A3* (pour revue : Lugnier 2006). Ces trois isoformes varient à leur extrémité N-terminale leur conférant des localisations différentes qui ont été déterminées au niveau cérébral : cytosolique pour la PDE2A1 (Sonnenburg et al. 1991) et particulière pour les deux autres isoformes (Murashima et al. 1990 ; Yang et al. 1994). La PDE2 est ainsi présente au niveau du sarcolemme à proximité des LTCC (Dittrich et al. 2001). Cette localisation membranaire semble liée à la myristoylation et/ou la palmitoylation de l'enzyme : une mutation de la glycine Gly 2 empêchant sa myristoylation se traduit par un changement de localisation avec une isoforme de PDE2 complètement soluble, alors qu'une palmitoylation des cystéines Cys 5 et Cys 11 rend l'enzyme partiellement soluble (Russwurm et al. 2009). Les PDE2 sont activées par le GMPc et hydrolysent à la fois l'AMPc et le GMPc. Elles contiennent en effet deux domaines GAF (GAF-A et GAF-B) impliqués dans la dimérisation des PDE2 (Martinez et al. 2002 ; Heikaus et al. 2009) au niveau de leur région N-terminale régulatrice, et la fixation de GMPc au niveau du domaine GAF-B entraîne une augmentation trente fois plus importante de l'activité d'hydrolyse de l'AMPc (Erneux et al. 1981). Ce mécanisme permet à la PDE2 de jouer un rôle dans le rétrocontrôle négatif permettant, par

son interaction à la fois avec les voies AMPc- et GMPc-dépendantes, de diminuer les niveaux de nucléotides cycliques en réponse à une augmentation de la concentration de GMPc (Bender et Beavo 2006).

Bien qu'elle ne soit pas la famille de PDE exprimée de façon majeure au niveau cardiaque, la PDE2 participe à la régulation du CEC (Mika et al. 2013) comme montré plus particulièrement au niveau du LTCC d'abord chez la grenouille (Hartzell et Fischmeister 1986 ; Dittrich et al. 2001) puis chez les mammifères au niveau auriculaire (Vandecasteele et al. 2001 ; Fischmeister et al. 2005) ainsi qu'au niveau ventriculaire mais uniquement sous stimulation β -AR (Verde et al. 1999). Cette diminution des taux d'AMPc par la PDE2 reste cependant limitée à certains compartiments subcellulaires comme suggéré par plusieurs études : la PDE2 contrôlerait l'AMPc au niveau du LTCC du fait de l'existence possible d'un microdomaine comprenant les récepteurs β -AR, des LTCC et de la PDE2 (Dittrich et al. 2001), et elle jouerait également un rôle dans la dégradation de l'AMPc au niveau des myofilaments du fait de l'augmentation de la phosphorylation de la TnI et de la MyBP-C par un inhibiteur sélectif de PDE2 (Mika et al. 2013). Ceci peut être mis en corrélation avec une étude qui a montré que la PDE2 contrôle également les taux de GMPc des fractions particulières de cardiomyocytes de rats adultes, et ce de manière exclusive (Castro et al. 2006). Il a également été montré que la PDE2 limite les signaux AMPc générés par une stimulation β -AR dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés et que ceci se traduit par une limitation de l'inotropisme cardiaque *via* une voie de signalisation NO-GMPc-dépendante (Mongillo et al. 2006). L'ensemble de ces résultats montre le rôle de la PDE2 dans la compartimentation des signaux AMPc. Très récemment, une étude du laboratoire a montré que la PDE2 est augmentée en IC chez l'Homme et dans des modèles animaux et qu'elle participe à la désensibilisation des réponses β -AR. La surexpression de PDE2 dans des cardiomyocytes de rat adulte réduit les effets pro-hypertrophiques des catécholamines, conduisant à l'hypothèse que sa surexpression constitue un mécanisme protecteur (Mehel et al. 2013), une hypothèse actuellement étudiée dans notre équipe.

c) PDE3

Les PDE3 cardiaques ont été purifiées pour la première fois sur des cœurs de bovins (Harrison et al. 1986). Elles sont codées par deux gènes *PDE3A* et *PDE3B* qui admettent respectivement trois variants (*PDE3A1*, 2 et 3) (Wechsler et al. 2002) et un seul variant

(PDE3B1) (Miki et al. 1996) (**Figure 17**). Les PDE3 sont les seules PDE à présenter une insertion de quarante-quatre acides aminés au niveau de leur domaine catalytique C-terminal qui semble jouer un rôle important dans la sensibilité de l'enzyme au GMPc (He et al. 1998). Chez l'Homme, ainsi que dans la plupart des espèces, la PDE3A constitue l'isoforme dominante au niveau cardiaque (Shakur et al. 2001). La PDE3B est exprimée dans le cœur de souris où elle pourrait représenter jusqu'à 50% de l'expression des PDE3 totales (Patrucco et al. 2004).

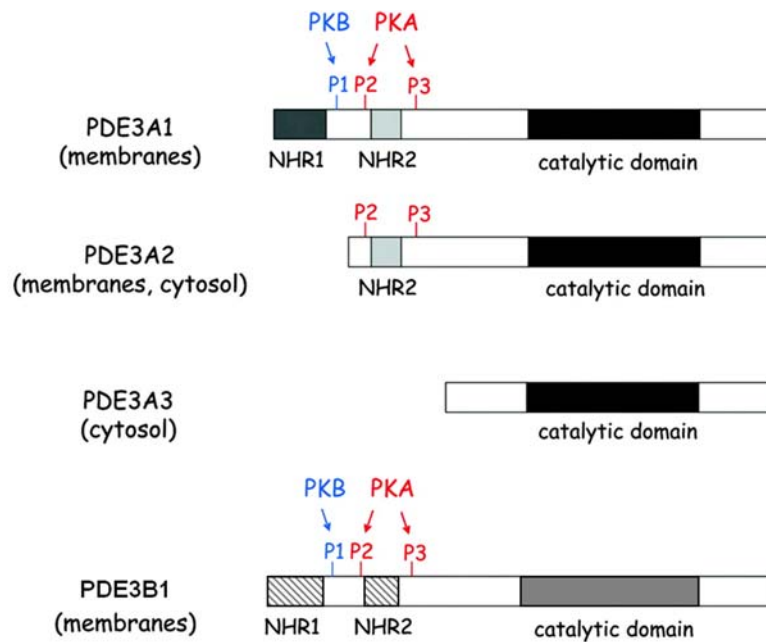


Figure 17 : Structure des isoformes de PDE3

Les structures des isoformes de PDE3 diffèrent par la présence ou non de domaines NHR (*N-terminal hydrophobic region*) et de sites de phosphorylation P1, P2, P3. (Modifié de Zaccolo et Movsesian 2007)

Les PDE3 présentent une structure similaire excepté au niveau de la région N-terminale avec la présence ou non de domaines hydrophobes d'association membranaire NHR1 et NHR2 (*N-terminal hydrophobic region*). Les formes cytosoliques sont générées par coupure protéolytique au niveau de leur domaine N-terminal, par l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription, ou par épissage de l'ARN messager (Kasuya et al. 1995). Si les formes PDE3A1 et PDE3B1 comportent les deux domaines NHR, PDE3A2 ne comporte que NHR2, et la forme PDE3A3 aucun (**Figure 17**). La présence des domaines d'association membranaire NHR dans les séquences des différentes isoformes détermine leur localisation (Leroy et al. 1996 ; Wechsler et al. 2002). Les PDE3 peuvent également comporter des sites de phosphorylation pour la PKA (Ser 312 et Ser 438) et la PKB (Ser

292), la phosphorylation des sites Ser 312 et Ser 292 active les PDE3 tandis que le rôle du site Ser 438 n'est pas clairement défini. Les PDE3A1 et B1 comportent les trois sites de phosphorylation, la PDE3A2 les deux sites PKA-spécifiques, la PDE3A3 aucun (Wechsler et al. 2002). Il a également été montré que la PKC peut activer la PDE3A en la phosphorylant sur le résidu Ser 428 (Pozuelo Rubio et al. 2005). Les PDE3 sont caractérisées par une forte affinité pour l'AMPc et le GMPc, avec une activité d'hydrolyse de l'AMPc environ dix fois supérieure à celle du GMPc (Shakur et al. 2001). Ainsi, le GMPc est faiblement hydrolysé et joue alors le rôle d'inhibiteur compétitif de l'hydrolyse d'AMPc (Keravis et Lugnier 2012).

L'expression de la PDE3 est très forte au niveau ventriculaire puisqu'elle constitue l'isoforme majoritairement exprimée chez l'Homme et la seconde chez le rat (Rochais et al. 2006 ; Richter et al. 2011 ; Johnson et al. 2012). La PDE3 est ainsi l'une des deux principales PDE responsable de la régulation de l'activité des LTCC chez le rat (Verde et al. 1999). Une inhibition des PDE3 potentialise ainsi l'activité du LTCC dans les myocytes atriaux humains ou de lapin (Kajimoto et al. 1997) ainsi que dans des myocytes ventriculaires de cobaye (Matsui et al. 1999) en condition basales, tandis que chez le rongeur, si l'inhibition de PDE3 n'a pas d'effet sur le LTCC en conditions basales, elle potentialise néanmoins l'augmentation de l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$ observée lors d'une stimulation β_1 -AR (Rochais et al. 2006) et de la phosphorylation du LTCC par la PKA (Mika et al. 2013). Cet effet sur le LTCC impliquerait une autre protéine kinase, la PI3K γ . Celle-ci a récemment été montrée comme jouant un rôle dans la modulation du degré de phosphorylation du LTCC à la suite de l'activation des β -AR par son rôle de protéine d'ancrage permettant de former un complexe macromoléculaire concentrant la PKA et plusieurs isoformes de PDE3. Les PDE3A (Ghigo et al. 2012) font partie d'un complexe macromoléculaire qui regroupe le LTCC et la PKA autour de la PI3K γ permettant ainsi un rétrocontrôle négatif par les PDE sur l'action stimulatrice de la PKA sur le courant $I_{Ca,L}$. Ce rôle de la PI3K γ au niveau du LTCC fait néanmoins débat (Kerfant et al. 2007). De plus, la phosphorylation des PDE3 par la PKA augmente leur activité d'hydrolyse de l'ATP ce qui constitue une boucle de rétrocontrôle permettant à la PKA de compartimenter son action pour la limiter dans le temps et l'espace (Sette et Conti 1996 ; Rochais et al. 2004). Les PDE3 sont également impliquées dans la régulation de l'activité de la SERCA2a en modulant l'action inhibitrice du PLB sur celle-ci. Ainsi, une inhibition des PDE3 accélère la cinétique de retour des transitoires Ca^{2+} chez le rat (Mika et al. 2013) et la souris (Beca et al. 2013) par augmentation de la phosphorylation du PLB (Mika et al. 2013). Cette régulation de l'activité de la SERCA2a est liée à la présence d'un

complexe regroupant la PDE3A, le PLB et la PKA à proximité directe de la SERCA2a grâce à la présence de l'AKAP7 δ (Lygren et al. 2007 ; Beca et al. 2013) dont l'existence a pu également être démontrée chez l'Homme (Ahmad et al. 2015). L'activité du RyR2 est aussi régulée par les PDE3 : une inhibition des PDE3 lors d'une stimulation β -AR entraîne une augmentation de la phosphorylation du canal par la PKA (Mika et al. 2013). Enfin, les PDE3 semblent également avoir un rôle au niveau des myofilaments puisqu'une inhibition des PDE3 augmente la phosphorylation de TnI et de MyBP-C (Mika et al. 2013). Notons que l'utilisation de souris présentant une délétion du gène codant pour PDE3A ou pour celui codant pour PDE3B a permis de montrer que les effets inotropes d'une inhibition de PDE3 au niveau cardiaque sont essentiellement dus à l'isoforme PDE3A (Sun et al. 2007).

Les PDE3, qui forment la famille de PDE majoritaire chez l'Homme, régulent donc le CEC cardiaque, leur inhibition présentant de puissants effets inotrope et lusitrope positifs chez les grands mammifères (Lugnier et al. 1993). Ces inhibiteurs de PDE3 peuvent potentialiser les effets d'une stimulation β -AR, ce qui a permis leur utilisation comme cardio-stimulants (milrinone), mais sont associés à des risques augmentés d'arythmie ainsi qu'au phénomène de mort cellulaire par apoptose lié à l'induction du facteur de répression transcriptionnelle ICER (*inducible cAMP early repressor*) qui inhibe l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (Ding et al. 2005 ; Yan et al. 2007).

d) *PDE4*

Les PDE4 cardiaques ont été isolées des PDE3 par l'utilisation d'un inhibiteur spécifiques des PDE4 : le rolipram (Komas et al. 1989). Elles sont codées par quatre gènes *PDE4A*, *PDE4B*, *PDE4C* et *PDE4D* conduisant à de nombreuses isoformes par épissage alternatif, chacune étant caractérisée par une structure protéique particulière (**Figure 18**). Dans le cœur, seuls les gènes *PDE4A*, *PDE4B* et *PDE4D* sont exprimés (Kostic et al. 1997). Chez le rongeur comme chez l'Homme, les PDE4 sont exprimées au niveau cardiaque et l'activité enzymatique globale des PDE4 est semblable dans ces deux espèces (Richter et al. 2011). Il faut cependant noter que l'activité des autres familles de PDE au niveau cardiaque, notamment les PDE1, 2 et 3, est très supérieure chez l'Homme en comparaison avec les rongeurs. Par conséquent, la proportion de l'activité de dégradation de l'AMPc portée par les PDE4 est beaucoup plus faible chez l'Homme (environ 10%) comparée à celle de la souris (environ 30%) ou du rat (entre 50% et 60%) (Richter et al. 2011). Cette étude a également

permis de classer les différentes isoformes en fonction de leurs activités respectives. Si chez l'Homme la PDE4D possède une activité largement supérieure à celle des deux autres isoformes dans le ventricule comme dans l'oreillette (Richter et al. 2011 ; Molina et al. 2012), chez le rongeur c'est la PDE4A qui présente la plus forte activité devant les deux autres isoformes confirmant ainsi des résultats obtenus précédemment par notre équipe chez le rat adulte (Abi-Gerges et al. 2009). Alors que le gène *PDE4A* ne code que pour une seule isoforme, le gène *PDE4B* génère trois variants d'épissage (PDE4B1-3) chez le rat (Kostic et al. 1997 ; Verde et al. 1999). D'autre part, de nombreux messagers du gène *PDE4D* sont détectés mais seules les isoformes protéiques PDE4D3, PDE4D5, PDE4D8 et PDE4D9 sont exprimées au niveau du cœur de rat (Richter et al. 2005). Les PDE4D8 et D9 sont majoritaires par rapport à la PDE4D3 qui n'est que faiblement exprimée (Richter et al. 2005). Les différentes isoformes de PDE4 peuvent également être divisées en trois groupes selon l'organisation de leur domaine N-terminal et la présence ou non de régions UCR (*upstream conserved region*) (Bolger et al. 1993) : les formes longues qui contiennent en N-terminal deux régions UCR, UCR1 et UCR2 ; les formes courtes qui contiennent uniquement UCR2 et les formes supercourtes qui ne comportent que la moitié de la région UCR2 (Richter et al. 2005) (**Figure 18**). Les régions UCR jouent un rôle important dans l'oligomérisation des PDE4 (Richter et Conti 2002 ; Xie et al. 2014) ainsi que dans la régulation de leur activité catalytique. En conditions basales, le domaine UCR2 interagit avec les domaines UCR1 et catalytique inhibant ainsi l'activité catalytique de la PDE4 (Beard et al. 2000). Lorsque le domaine UCR1 est phosphorylé par la PKA, ceci provoque un changement de conformation protéique qui permet la libération du domaine catalytique vis-à-vis du domaine UCR2 et entraîne ainsi une augmentation de l'activité de dégradation (Lim et al. 1999 ; pour revue : Houslay et Adams 2010). Il a été montré très récemment que l'activité de la PDE4D est également régulée par la CaMKII : une phosphorylation de la PDE4D par la CaMKII augmente son activité d'hydrolyse de l'AMPc (Mika et al. 2015). En plus de réguler l'activité catalytique des PDE4, les deux modules UCR jouent un rôle important dans les processus de dimérisation de l'enzyme (Houslay et al. 2007) ainsi que dans l'interaction des PDE4 avec de nombreuses autres protéines telles que les AKAP comme montré par l'équipe de John Scott (Dodge-Kafka et al. 2005). Les résultats de cette étude sont un parfait exemple de la régulation de l'activité d'une PDE4, la PDE4D3, par différentes protéines présentes au sein d'un même complexe formé autour de la mAkap (AKAP6) : la présence de la PKA dans ce complexe (Kapiloff et al. 2001) permet d'augmenter l'activité d'hydrolyse de l'AMPc par la PDE4D3 lorsqu'elle est phosphorylée, la présence d'ERK5 permet de diminuer le

métabolisme de l'AMPc lorsqu'elle phosphoryle la PDE4D3, et enfin l'activation d'Epac à l'intérieur de ce complexe permet l'activation de Rap1 qui réprime l'activation de ERK5 et donc son effet sur la PDE4D3. La présence de tels complexes macromoléculaires regroupant diverses protéines autour d'un même effecteur final permet une fine modulation de l'activité des protéines-cibles, notamment des protéines impliquées dans le CEC cardiaque que nous allons décrire ci-dessous. Auparavant, il faut tout-de-même noter un autre mécanisme de régulation de l'activité des PDE4 : exceptée la PDE4A, toutes les isoformes de PDE4 possèdent à leur extrémité C-terminale un site de phosphorylation par ERK2 qui module différemment leur activité selon qu'il s'agisse de formes courtes (activation) ou longues (inhibition) (Hoffmann et al. 1999).

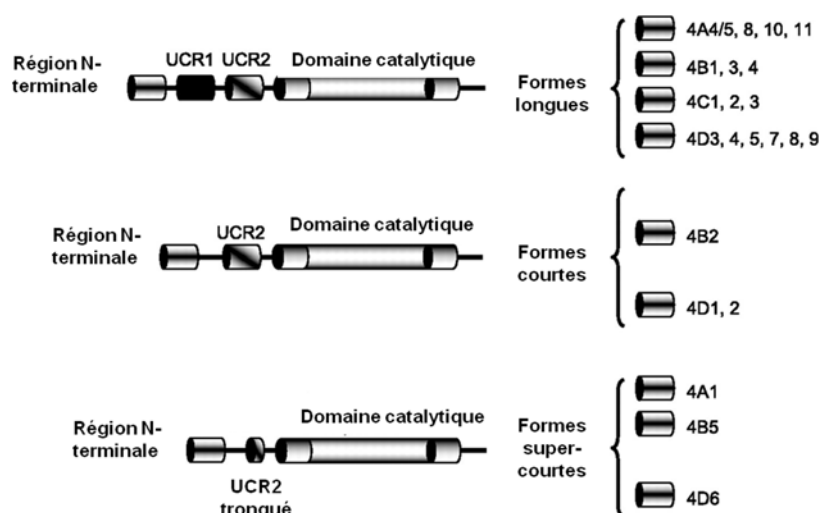


Figure 18 : Les trois groupes d'isoformes de PDE4

Les isoformes de PDE4 sont divisées en 3 groupes en fonction de leur région N-terminale. Les formes longues présentent les domaines UCR1 et UCR2 (*upstream conserved region*), les formes courtes ne possèdent pas UCR1, et les formes super-courtes ne présentent que la moitié du domaine UCR2. Les gènes correspondants sont reportés à droite de la figure. (D'après Houslay et al. 2007)

Les PDE4 hydrolysent spécifiquement l'AMPc et ne sont pas régulées par le GMPc (Komas et al. 1989). Par cette activité de dégradation de l'AMPc, les PDE4 sont impliquées de manière importante dans la régulation du CEC cardiaque chez le rat et la souris où elles représentent une part importante de l'activité totale de dégradation de l'AMPc (Leroy et al. 2008 ; Richter et al. 2011) mais aussi du fait de la possibilité de voir leur activité augmentée lorsqu'elles sont phosphorylées par la PKA comme décrit précédemment dans ce chapitre (Sette et Conti 1996 ; Lim et al. 1999 ; Rochais et al. 2004). Si en conditions basales la PDE3 joue le rôle principal dans la régulation du CEC dans les myocytes ventriculaires, la PDE4

devient la principale PDE responsable de la régulation du CEC pour dégrader l'AMPc produit lors d'une stimulation β -AR (Verde et al. 1999 ; Mongillo et al. 2004 ; Mika et al. 2013). Cette activité des PDE4 dans la limitation des signaux AMPc varie selon le type de récepteur β -AR, avec un rôle des PDE4 prépondérant dans le contrôle des signaux AMPc issus de la stimulation des récepteurs β_1 -AR (Nikolaev et al. 2006 ; Fu et al. 2014) mais aussi dans la régulation plus localisée des signaux issus de l'activité des β_2 -AR en combinaison avec les PDE3 (Rochais et al. 2006). Lors d'une stimulation β -AR, la PDE4 devient ainsi la principale PDE responsable de la régulation de l'activité des LTCC (Verde et al. 1999), et si deux isoformes PDE4B et PDE4D sont associées à la sous-unité principale du canal, des expériences sur des souris présentant une délétion pour les gènes *PDE4B* ou *PDE4D* ont montré que la PDE4B est l'isoforme majoritaire dans la régulation du LTCC lors d'une stimulation β -AR chez la souris (Leroy et al. 2011). La présence des PDE4A et PDE4B dans un complexe macromoléculaire qui regroupe le LTCC et la PKA autour de la $PI3K\gamma$ a aussi été montrée (Ghigo et al. 2012) même si, comme écrit pour les PDE3A et B, le rôle de la $PI3K\gamma$ au niveau du LTCC est sujet à controverse (Kerfant et al. 2007). Les PDE4 régulent également d'autres protéines impliquées dans la régulation du CEC, ceci grâce à leur localisation spécifique au voisinage de ces cibles dans des complexes moléculaires organisés autour d'AKAP. Bien qu'il ait été montré que toutes les familles de PDE4 (A, B, C et D) peuvent former des complexes stables avec la β -arrestine (Perry et al. 2002), on dénombre à ce jour au niveau des récepteurs β -AR trois isoformes de PDE4 (les PDE4D5, PDE4D8 et PDE4D9) qui se fixent soit directement au β -AR lui-même (Richter et al. 2008 ; Richter et al. 2013), soit *via* la β -arrestine (Baillie et al. 2003 ; De Arcangelis et al. 2009 ; Berthouze-Duquesnes et al. 2013). Il a été montré que la présence de la PDE4D5 joue un rôle important dans la signalisation β_2 -AR en étant recrutée dans un complexe avec la β -arrestine lorsque celle-ci se fixe aux récepteurs β_2 -AR activés : la PDE4D5 régule ainsi l'activation de la PKA responsable du passage de la signalisation β_2 -AR de la protéine G_s vers la protéine G_i (Baillie et al. 2003). L'activité du RyR2 semble être contrôlée à la fois par des PDE4B et des PDE4D (Lehnart et al. 2005 ; Mika et al. 2014) bien qu'à ce jour seule la PDE4D3 ait pu être identifiée à la surface du RS au niveau de la diade, dans un complexe avec le RyR2 regroupant autour de la mAKAP (AKAP6) la PKA, la calstabin2 (FKBP12.6) et les phosphatases PP1 et PP2A (Marx et al. 2000 ; Lehnart et al. 2005 ; Wehrens et al. 2005). La présence de la PKA à proximité immédiate de la PDE4D3 permet d'augmenter son activité d'hydrolyse de l'AMPc : la PDE4D3 présente deux sites de phosphorylation dépendants de la PKA, la phosphorylation de la Ser 13 qui renforce la liaison entre la PDE4D3 et la mAKAP,

et la phosphorylation de la Ser 54 qui active la PDE4D3 elle-même de manière allostérique avec une activité d'hydrolyse de l'AMPc doublée ou triplée (Dodge et al. 2001 ; Carlisle Michel et al. 2004). En outre, la présence concomitante de PP1, PP2A et de la PDE4D3 constitue un mécanisme supplémentaire de contrôle de l'activité du RyR2 en contrôlant respectivement l'état de phosphorylation du canal ainsi que la concentration locale d'AMPc.

La PDE4D3 est également localisée dans la région périnucléaire (Dodge et al. 2001) dans un complexe qui regroupe la PKA, ERK5, Epac et Rap1 autour de la mAKAP (AKAP6) (Dodge-Kafka et al. 2005). Ce complexe pourrait ainsi jouer un rôle dans la régulation de l'expression génique au niveau cardiaque avec la présence de la PKA et de la PDE qui forme donc une boucle de rétrocontrôle négatif. On trouve également la PDE4D3 au niveau des sarcomères ancrée à la myomégaline (Verde et al. 2001), ou encore au sarcolemme associée aux canaux K^+ KCNQ1/KCNE1 responsables du courant I_{Ks} par un ancrage à la protéine Yotiao (AKAP9) (Terrenoire et al. 2009).

e) PDE8

La PDE8A semble également être impliquée dans la régulation du CEC cardiaque, bien que les résultats de cette étude réalisée chez la souris (Patrucco et al. 2010) n'aient, à ce jour, pas été confirmés par une autre étude dans un autre modèle. Les souris présentant une délétion du gène codant pour la PDE8A présentent ainsi une augmentation de la fréquence de survenue d'étincelles Ca^{2+} (*sparks*) enregistrées en conditions basales, et une augmentation à la fois des niveaux d'AMPc, du degré d'activation de la PKA, de l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$ et des transitoires Ca^{2+} enregistrées sous stimulation β -AR. Le faible nombre d'informations quant aux rôles de la PDE8 est largement dû au manque d'inhibiteurs sélectifs de cette isoforme ainsi qu'au fait qu'elle ne soit, contrairement à la majorité des autres PDE, pas sensible au principal inhibiteur non-sélectif des PDE : l'IBMX (Hayashi et al. 1998 ; Soderling et al. 1998). La découverte récente d'un inhibiteur sélectif, le PF-04957325 (Vang et al. 2010 ; Tsai et al. 2011), devrait permettre d'élargir le champ des connaissances sur les rôles des PDE8.

III. La CaMKII : une autre protéine kinase régulant le CEC

Les protéines kinases dépendantes du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, ou CaMK, font partie de la famille des sérines/thréonine kinases. On dénombre quatre familles de CaMK (CaMKI, II, IV et K) qui diffèrent par leurs distributions et leurs substrats respectifs (pour revue : Skelding et al. 2011). Parmi celles-ci, la CaMKII, distribuée dans l'organisme de manière ubiquitaire, est la famille majoritairement exprimée dans le cœur.

A. Structure et régulation de la CaMKII

La CaMKII a été identifiée pour la première fois dans du cortex cérébral de bœuf en raison de sa dépendance au complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ pour être activée et pouvoir phosphoryler ses cibles (Schulman et Greengard 1978 ; Schulman et Greengard 1978). Les CaMKII sont des protéines multimériques qui forment en général une rosace sous forme d'un dodécamère (douze sous-unités) (Woodgett et al. 1983) même si une forme tétradécamérique (quatorze sous-unités) est possible (Rellos et al. 2010). Chaque monomère est formé de trois domaines distincts : un domaine portant le site catalytique de l'enzyme à l'extrémité N-terminale (domaine catalytique), un domaine d'auto-inhibition pouvant lier la CaM et comportant des sites de phosphorylation (domaine régulateur), et un domaine C-terminal permettant l'interaction des monomères entre eux pour former l'holoenzyme (pour revue : Stratton et al. 2013) (**Figure 19**). Chez l'Homme, il existe quatre gènes codant pour quatre familles de CaMKII, les formes α , β , δ et γ , à l'origine de plusieurs dizaines d'isoformes dues à l'épissage alternatif de ces gènes (Tombes et al. 2003). Si les formes δ et γ sont présentes dans le myocarde (Tobimatsu et Fujisawa 1989), la CaMKII δ est l'isoforme cardiaque prédominante et est représentée au niveau cardiaque chez le mammifère par deux sous-types CaMKII δ_B et δ_C générés par épissage alternatif (Edman et Schulman 1994 ; Hoch et al. 1998) et qui présentent des localisations intracellulaires différentes : CaMKII δ_B dans le noyau et CaMKII δ_C dans le cytoplasme pour contrôler le CEC (Srinivasan et al. 1994 ; pour revue : Gray et Heller Brown 2014).

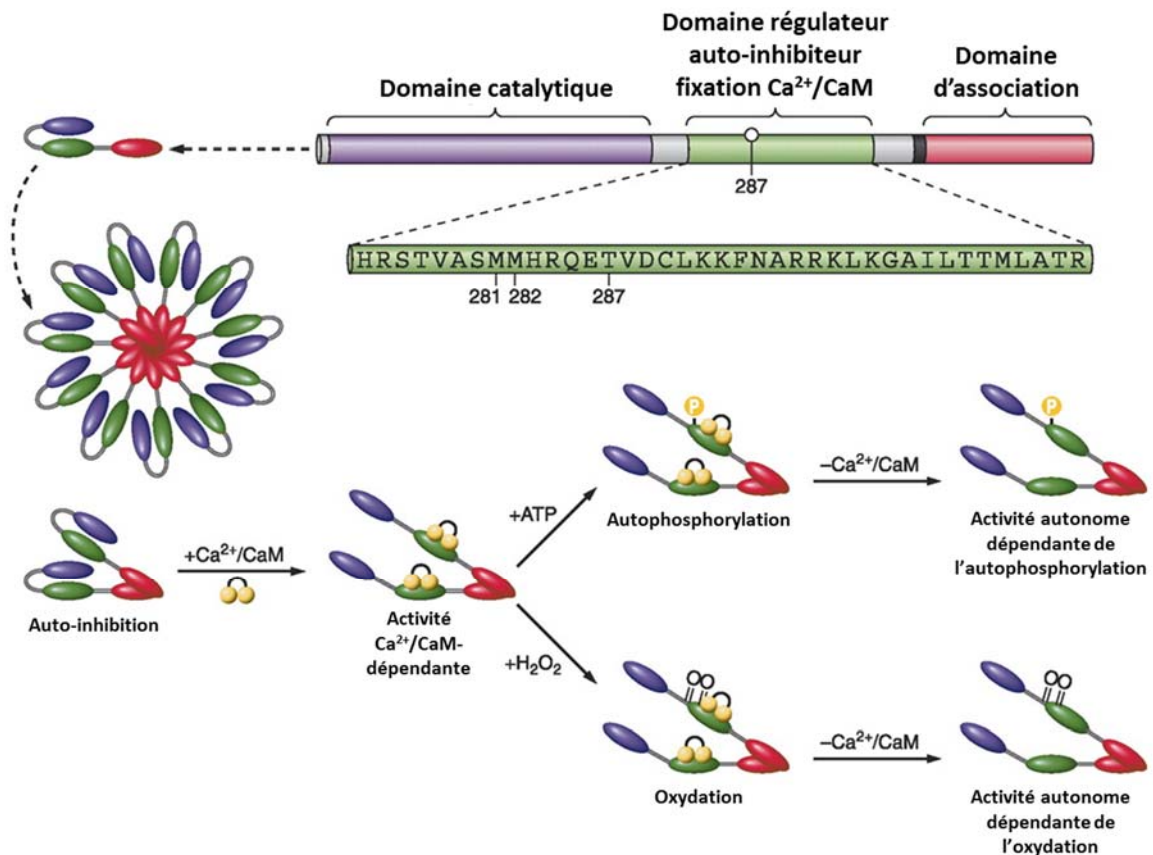


Figure 19 : Structure et modes d'activation de la CaMKII

La CaMKII est une holoenzyme formée de monomères contenant chacun un domaine d'association permettant aux monomères de se lier les uns aux autres, un domaine de régulation et un domaine catalytique. Quand la CaMKII n'est pas stimulée, les domaines catalytiques sont repliés sur les domaines régulateurs masquant ainsi le site catalytique : la CaMKII est auto-inhibée. La fixation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ induit un changement de conformation qui libère le domaine catalytique. L'oxydation et l'autophosphorylation peuvent conduire à une activation de la CaMKII qui devient indépendante du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ par une modification d'acides aminés spécifiques situés sur le domaine régulateur. (D'après Erickson et al. 2011)

Le mode d'activation classique de la CaMKII est dépendant du Ca^{2+} . Lorsque la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique augmente au-delà de 100 nM (Schulman et Greengard 1978), le Ca^{2+} se fixe à la CaM pour former un complexe qui se fixe sur le domaine d'auto-inhibition de la CaMKII, ce qui entraîne un changement de conformation protéique libérant le domaine catalytique de la kinase (Lou et al. 1986) (**Figure 19**). La CaMKII ainsi activée par la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ($\text{EC}_{50} = 0,3 \mu\text{M}$ (Schulman et Greengard 1978)) est donc capable de phosphoryler des protéines substrats, mais ce changement de conformation permet aussi de découvrir un résidu thréonine, la Thr 286/287 (variable selon les espèces, souris/Homme), qui est phosphorylable par la CaMKII elle-même *via* un monomère voisin. Lorsque la CaMKII est phosphorylée sur son site Thr 286/287, ceci empêche la réassociation du domaine régulateur avec le domaine catalytique par un blocage stérique, maintenant ainsi l'activité

catalytique de la CaMKII en absence de Ca^{2+} (Saitoh et Schwartz 1985 ; Lou et al. 1986 ; Schworer et al. 1988) (**Figure 19**). Toutefois, ce mécanisme est contrebalancé par l'action des PP1 qui limitent la phosphorylation de la Thr 286/287 (Bradshaw et al. 2003), ce qui semble réduire la survenue de ce phénomène à des cas de stress aigus (forte augmentation de la concentration en Ca^{2+} supérieure au μM) et/ou prolongés, et non lors des oscillations de Ca^{2+} observées en conditions physiologiques (Saucerman et Bers 2008). C'est ainsi que lors d'une activation aigüe ou prolongée de la CaMKII, deux monomères contigus peuvent chacun phosphoryler la Thr 286/287 de l'autre monomère associé, l'activation de l'un favorisant le recrutement du domaine régulateur de l'autre et ainsi une propagation de l'état auto-activé à l'ensemble des monomères formant une même holoenzyme (Chao et al. 2010 ; pour revue : Stratton et al. 2013). Un second mécanisme d'auto-activation de la CaMKII, indépendamment du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, a été démontré : dans le cas d'un stress oxydant, le niveau élevé d'espèces réactives oxygénées entraîne l'oxydation des méthionines 281/282 ce qui permet, là-encore, une activation prolongée et autonome de la CaMKII (Erickson et al. 2008) (**Figure 19**). En outre, il existe un troisième mécanisme d'activation autonome de la CaMKII, mis en évidence en 2013 et qui survient chez les patients diabétiques : la O-glycosylation de la Ser 279 provoquée par l'hyperglycémie entraîne là-aussi une activation prolongée de la CaMKII indépendamment du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Erickson et al. 2013).

Enfin, la CaMKII peut également être activée par Epac comme l'équipe de F. Lezoualc'h l'a démontré au sein de notre laboratoire en collaboration avec l'équipe d'A.-M. Gomez (Pereira et al. 2007). Comme décrit dans le chapitre II.B.2, Epac est directement activé par l'AMPc (de Rooij et al. 1998 ; Kawasaki et al. 1998). Epac est donc un acteur d'une voie de signalisation qui aboutit à l'activation de la CaMKII en réponse à une stimulation β -AR, comme pour les deux premiers mécanismes d'activation de CaMKII décrit précédemment. Cependant, cette activation de la CaMKII *via* Epac est indépendante de l'action de la PKA (Smrcka et al. 2007). Il s'agit donc d'une voie d'activation distincte de la voie d'activation "classique" de la CaMKII, une voie "classique" qui nécessite des niveaux élevés de Ca^{2+} qui découlent de la potentialisation du cycle du Ca^{2+} par l'activation dépendante de la PKA des protéines clés impliquées dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} cellulaire. Le recoupement des travaux de Pereira et al. et de Oestreich et al., a permis l'émergence d'un consensus sur la voie de signalisation suivante : Epac active Rap qui active à son tour la PLC ϵ (Schmidt et al. 2001 ; Oestreich et al. 2007) ; la PLC ϵ , en produisant du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP_3) va entraîner une libération de Ca^{2+} *via*

les récepteurs de l'IP₃, ce qui active la CaMKII (Pereira et al. 2012) possiblement *via* l'action de la PKC (Oestreich et al. 2009). L'existence d'une interaction entre la β -arrestine et la CaMKII δ a d'abord été mise en évidence par le groupe de R. Lefkowitz (Xiao et al. 2007). Ceci a ensuite permis au groupe de H. Rockman de mettre en évidence la présence concomitante d'Epac et de la CaMKII δ au sein d'un complexe formé autour de la β -arrestine chez la souris, proposant ainsi une voie d'activation de la CaMKII faisant intervenir les β_1 -AR et Epac1 (Mangmool et al. 2010), une voie également mise en évidence par le groupe de F. Lezoualc'h qui a montré son implication dans l'export nucléaire pro-hypertrophique de HDAC4 (Berthouze-Duquesnes et al. 2013). Ceci est en accord avec les résultats d'une étude précédente montrant qu'une stimulation β_1 -AR prolongée augmente la contractilité des cardiomyocytes indépendamment de la PKA et faisant intervenir la CaMKII comme kinase majeure régulant le CEC lors de l'activation chronique des récepteurs β -AR (Wang et al. 2004).

B. Actions de la CaMKII sur ses cibles impliquées dans la régulation du CEC

Comme décrit ci-dessus, la CaMKII peut être activée lors d'une stimulation β -AR. Comme nous l'avons vu dans le chapitre portant sur la PKA, une stimulation β -AR provoque une modification du CEC cardiaque par l'action de la protéine kinase sur ses protéines-cibles qui sont des protéines clés du CEC. Or, la CaMKII peut phosphoryler la plupart des cibles de la PKA impliquées dans le CEC à savoir les canaux LTCC, le PLB, le RyR2, ainsi que des cibles nucléaires impliquées dans le CET et la transcription de gènes (pour revue : Skelding et al. 2011) (**Figure 20**).

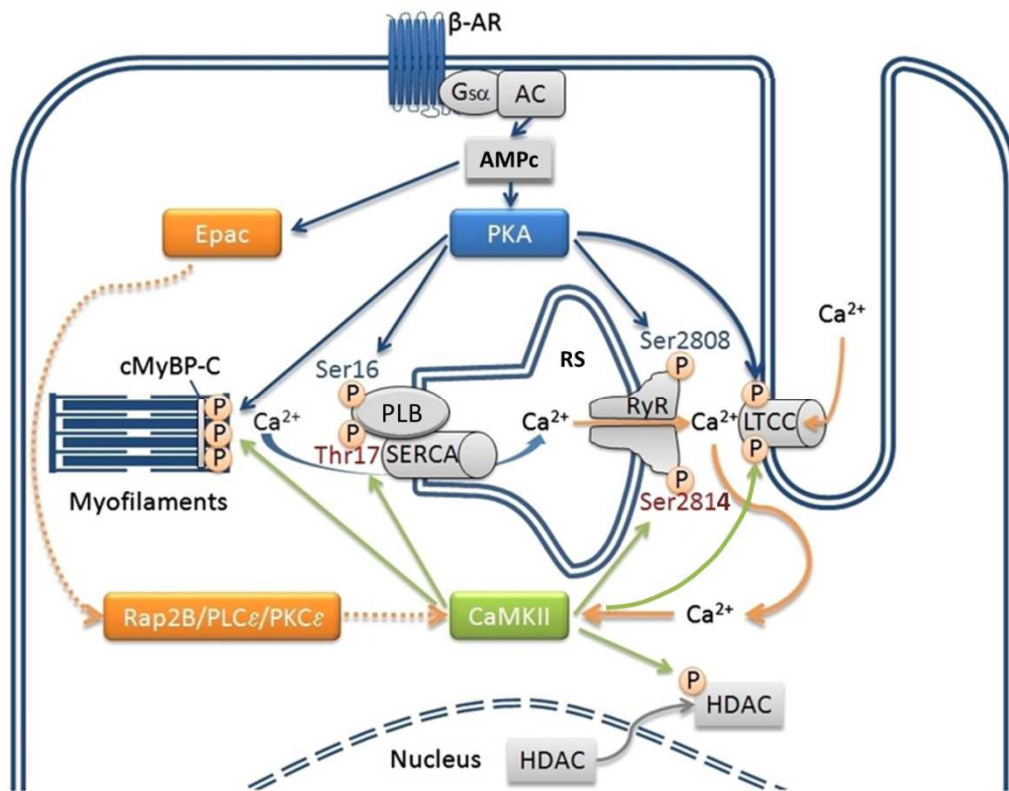


Figure 20 : Schéma des mécanismes d'activation de la CaMKII lors d'une stimulation β-adrénérique et effets de son activation sur le CEC et le CET dans le cœur

La CaMKII peut être activée par deux voies différentes, l'une dépendant de la PKA et de son action stimulatrice sur le cycle du Ca²⁺ intracellulaire, l'autre dépendant d'Epac. β-AR : récepteur β-adrénérique, LTCC : canal Ca²⁺ de type L, Gα : sous-unité α de la protéine Gs, AC : adénylate cyclase, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, Epac : facteur d'échange des petites protéines G, RS : réticulum sarcoplasmique, PLB : phospholamban, SERCA : pompe Ca²⁺-ATPase du RS, RyR : récepteur de la ryanodine, CaMKII : Ca²⁺/calmoduline kinase II, HDAC : histone déacétylase, cMyBP-C : protéine C cardiaque de liaison à la myosine, PLCε : phospholipase Cε, PKCε : protéine kinase Cε. (Adapté de Grimm et Brown 2010)

Comme précisé dans le chapitre I.B.2, l'activité du LTCC peut être régulée par la CaMKII qui possède un site de fixation sur la sous-unité β_{2a} ce qui lui permet de phosphoryler la sous-unité β_{2a} sur la Thr 498 mais aussi la sous-unité α_{1C} directement (sur un site non-déterminé à ce jour) permettant d'augmenter la probabilité d'ouverture du canal (Anderson et al. 1994 ; Xiao et al. 1994 ; Koval et al. 2010). Ce mécanisme intervient notamment dans le phénomène de facilitation avec pour conséquence une augmentation de l'amplitude du courant I_{Ca,L} et une diminution de la cinétique de son inactivation (Yuan et Bers 1994). Ces régulations sont permises par la présence de la CaMKII à proximité directe du LTCC permettant notamment l'interaction de la CaMKII avec l'extrémité C-terminale de la sous-unité α_{1C} (Hudmon et al. 2005) ainsi qu'avec la sous-unité β_{2a} (Abiria et Colbran 2010).

Le PLB est aussi régulé par la CaMKII. En effet, la CaMKII peut phosphoryler le PLB sur son résidu thréonine (Simmerman et al. 1986 ; Wegener et al. 1986) situé en position 17 (Wegener et al. 1989), ce site étant exclusivement phosphorylé par la CaMKII. Si plusieurs études ont montré le rôle prépondérant du PLB dans la réponse à une stimulation β -AR dans le cœur de mammifère (Luo et al. 1994 ; Hoit et al. 1995), le rôle de la phosphorylation de la Thr 17 par la CaMKII apparaît être secondaire par rapport à celui de la PKA dans les effets liés à une stimulation β -AR. En effet, des expériences *in vivo* ont d'abord montré que la phosphorylation du PLB en Ser 16 est un pré-requis pour la phosphorylation de la Thr 17 (Luo et al. 1998 ; Said et al. 2002), puisque la Ser 16 peut être phosphorylée indépendamment de la Thr 17 mais que la phosphorylation de la Ser 16 est suffisante pour atteindre les effets cardiaques maximaux en réponse à une stimulation β -AR (Chu et al. 2000). Ce schéma peut néanmoins varier lors d'une stimulation β -AR intense ou lors d'une augmentation de la fréquence de contraction : pour de fortes concentrations d'isoprénaline, un agoniste non-sélectif des β -AR, l'augmentation du degré de stimulation de la voie β -AR s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de la Thr 17, son rôle dans la régulation de la SERCA2a devenant équivalent à celui joué par la Ser 16 phosphorylée (Said et al. 2002), de plus, pour une fréquence de stimulation soutenue, la phosphorylation de la Thr 17 apparaît être le contributeur majeur de l'adaptation des paramètres de contraction et de relaxation dans les cardiomyocytes de souris (Zhao et al. 2004).

Le RyR2 est également associé à la CaMKII même si le site et les mécanismes de liaison de la CaMKII au RyR2 restent inconnus à ce jour. Le RyR2 présente trois sites de phosphorylation (Ser 2808, Ser 2814 et Ser 2830) et les sites phosphorylés par la CaMKII sont sujets à controverse (Camors et Valdivia 2014). Le schéma actuel considère que la CaMKII, malgré qu'elle ait été montrée comme pouvant participer à la phosphorylation du RyR2 sur le site Ser 2808 (Witcher et al. 1991), est l'acteur exclusif de la phosphorylation de la Ser 2814 lors d'une stimulation β -AR (Huke et Bers 2008). D'autre part, l'importance des conséquences fonctionnelles de la phosphorylation du RyR2 par la CaMKII est également controversée (Bers et Grandi 2009). Si le fait qu'une phosphorylation de la Ser 2814 par la CaMKII active le RyR2 en augmentant sa probabilité d'ouverture et sa sensibilité au Ca^{2+} (Wehrens et al. 2004) est largement admis (pour revue : Camors et Valdivia 2014) malgré une étude des années 1990 présentant un effet inhibiteur (Lokuta et al. 1995), le rôle majeur de cette régulation sur l'homéostasie Ca^{2+} est remis en cause par les travaux d'A. Marks qui prêtent le rôle majeur de l'activation du RyR2 à la phosphorylation de la Ser 2808 par la PKA

qui régule sa probabilité d'ouverture *via* la calstabile 2 (Marx et al. 2000). Néanmoins, des études réalisées sur des souris présentant un site spécifique de la PKA non-phosphorylable (la Ser 2808 est remplacée par une alanine) montrent une réponse β -AR inchangée chez ces animaux qui ne sont pas protégés contre les effets délétères d'une stimulation β -AR chronique ce qui constitue un solide argument en faveur d'un rôle majeur de la régulation du RyR2 par la CaMKII faisant intervenir la Ser 2814 (Benkusky et al. 2007 ; MacDonnell et al. 2008).

La CaMKII peut également agir directement sur les protéines des myofilaments. La CaMKII peut phosphoryler la MyBP-C sur l'un des trois sites ciblés par la PKA : la Ser 282 (Gautel et al. 1995). La phosphorylation de ce site permet en outre la phosphorylation des deux autres sites Ser 273 et Ser 302 qui ne sont pour leur part phosphorylés que par la PKA. Ce rôle de la CaMKII dans la régulation de la vitesse de relaxation et de cyclage des ponts actine-myosine a été confirmé par une étude montrant qu'une inhibition de la CaMKII réduit le degré de phosphorylation de la MyBP-C et que ceci corrèle avec une diminution de la force développée par la fibre musculaire sans changement des transitoires Ca^{2+} (Tong et al. 2004). Cette étude a par ailleurs montré que l'inhibition de la CaMKII ne réduit pas seulement la phosphorylation de la MyBP-C, elle réduit en parallèle le degré de phosphorylation de la TnI, influençant donc le rôle de la protéine responsable de la sensibilité au Ca^{2+} des myofilaments.

Enfin, la CaMKII joue également un rôle dans le CET. CaMKII agit principalement au niveau des HDAC4 et 5 : la phosphorylation des résidus Ser 259 et Ser 498 par la CaMKII entraîne le recrutement des HDAC4 et 5 par la protéine chaperonne 14-3-3 ce qui entraîne son export en dehors du noyau. L'export des HDAC supprime leur action répressive exercée normalement sur le facteur MEF2 ce qui aboutit à la transcription de gènes pro-hypertrophiques (McKinsey et al. 2000). Ces effets dépendants de la CaMKII ont d'ailleurs été récemment reliés à la voie de signalisation Epac-CaMKII *via* HDAC4 (Berthouze-Duquesnes et al. 2013) et *via* HDAC5 (Pereira et al. 2012). Notons aussi que cette voie HDAC-MEF2 fait intervenir d'autres canaux Ca^{2+} , les récepteurs de l' IP_3 (IP_3R) (Wu et al. 2006), qui sont eux-aussi la cible de la CaMKII : leur phosphorylation par la CaMKII réduit leur probabilité d'ouverture, et par suite leur activité (Bare et al. 2005), ce qui constitue un mécanisme de rétrocontrôle protecteur contre l'hypertrophie induite lorsque les IP_3R sont activés (Wu et al. 2006). Mais d'autres études ont pu montrer le rôle de la CaMKII dans la régulation de la voie pro-hypertrophique CaN-NFAT ou encore dans la régulation de la voie anti-hypertrophique faisant intervenir CREB. Ainsi, des souris transgéniques surexprimant la CaMKII δ_B présentent une expression et une activité augmentée de la CaN qui est impliquée

dans la voie pro-hypertrophique CaN-NFAT (Zhang et al. 2002), tandis que la phosphorylation de CREB par la CaMKII sur la Ser 142 a un effet pro-hypertrophique (Wu et McMurray 2001). La CaMKII a également été associée au phénomène d'apoptose notamment lors de la reperfusion tissulaire après une atteinte ischémique irréversible (Mattiuzzi et al. 2015).

En conclusion, la CaMKII intervient dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} et du CEC en phosphorylant les protéines clés de ces mécanismes. En conditions basales le rôle de la CaMKII semble limité (Mika et al. 2013) car dépendant d'une augmentation de la fréquence cardiaque chez le rongeur (Kushnir et al. 2010 ; Dries et al. 2013). Il apparaît néanmoins que la CaMKII devient un élément essentiel de la régulation de l'homéostasie calcique et du CEC lorsque le stress β -AR est prolongé ou aigu, avec une majorité d'études montrant un effet délétère de l'activation de la CaMKII pouvant mener à la dérégulation de l'homéostasie Ca^{2+} ou à l'apoptose (Zhu et al. 2003 ; Wang et al. 2004) bien qu'une étude ait récemment montré un possible effet cardioprotecteur de l'activation de la voie de signalisation Epac-CaMKII (Zhang et al. 2013).

IV. Voies de l'AMPc, dérégulation du CEC et arythmies

Comme décrit lors des chapitres précédents, deux voies de signalisations sont donc impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique lors d'une stimulation β -AR : une voie dépendante de la PKA, et une voie dépendante de la CaMKII. Ces deux voies peuvent agir en parallèle : lors d'une stimulation β -AR, l'activation des récepteurs β -AR entraîne une augmentation de la production d'AMPc par les AC et cet AMPc peut activer directement la PKA et Epac. La PKA régule directement le CEC en phosphorylant les protéines clés du CEC (Bers 2002), tandis qu'Epac active la CaMKII (Oestreich et al. 2009 ; Pereira et al. 2012) qui phosphoryle les mêmes cibles que la PKA mais sur des sites différents. Cependant, ces deux voies de signalisation apparaissent également être interconnectées, avec l'activation de la CaMKII dépendante du Ca^{2+} *via* la formation du complexe Ca^{2+} /CaM (Schulman et Greengard 1978 ; Schulman et Greengard 1978) qui nécessite la potentialisation préalable du cycle de Ca^{2+} par l'activation de la PKA. Ce schéma de fonctionnement, avec l'intervention de la CaMKII en aval de la PKA, est notamment étayé par l'observation que la phosphorylation du PLB sur son site spécifique de la PKA (Ser 16) est un pré-requis pour la

phosphorylation du résidu ciblé spécifiquement par la CaMKII (Thr 17) (Luo et al. 1998 ; Said et al. 2002). Ces voies de signalisation possèdent malgré tout un point commun : elles potentialisent le cycle du Ca^{2+} , adaptation nécessaire pour augmenter le CEC cardiaque pour faire face aux conditions de stress. Cependant, une stimulation aiguë ou chronique de la voie β -AR peut aboutir à des phénomènes arythmiques comme c'est le cas dans les cas de tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (CPVT) ou dans l'IC. La chronicité de stimulation β -AR dans l'IC entraîne une désensibilisation des récepteurs β -AR (Bristow et al. 1986), et par suite une diminution de la synthèse d'AMPc (Feldman et al. 1987) qui, ajoutée à une diminution de l'expression de la SERCA2a observée dans l'IC (Meyer et al. 1995), tend à diminuer progressivement le travail cardiaque. Ces effets négatifs sont alors contrebalancés par une diminution de l'expression et de l'activité de la plupart des PDE qui dégradent l'AMPc exceptée la PDE2 (Ding et al. 2005 ; Abi-Gerges et al. 2009 ; Mehel et al. 2013). Cette réduction des niveaux de PDE provoque une hyper-activation du CEC qui apparaît être délétère à long terme. En effet, une activation chronique de la voie β -AR a ainsi été montrée comme induisant une surcharge en Ca^{2+} dans les cardiomyocytes du fait d'une possible augmentation de l'activité des LTCC (Schroder et al. 1998) (notons tout de même une hétérogénéité de résultats dans la littérature avec des études montrant une absence de modification du courant $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ (Gomez et al. 1997 ; pour revue : Marx et al. 2000) associée à une hyper-sensibilité du RyR2 qui présente un état de sous-conductance en diastole (Marx et al. 2000).

Si les mécanismes à l'origine de la surcharge calcique des cellules font l'objet d'un consensus, avec un rôle prépondérant de la phosphorylation du PLB par la PKA (Ser 16) (Chu et Kranias 2002) probablement amplifié par une phosphorylation supplémentaire par la CaMKII (Thr17) (Said et al. 2002 ; Neef et al. 2013) pour augmenter l'activité de la SERCA2a et aussi entretenir un certain taux de remplissage du RS malgré la fuite de Ca^{2+} via les RyR2, les mécanismes à l'origine de l'hyperactivité du RyR2 font l'objet d'une controverse. Plusieurs courants de pensées s'affrontent, dont deux principaux que nous allons décrire ici. En 2000, le groupe de A. Marks publiait une étude faisant ressortir une très forte augmentation du degré de phosphorylation du RyR2 au niveau de la Ser 2808 dans des cœurs humains défaillants (Marx et al. 2000). Cette hyper-phosphorylation du RyR2 par la PKA entraîne, toujours selon cette étude, une dissociation de la calstabin 2, des résultats confirmés par une études du groupe de F. Lai (Blayney et al. 2010). La dissociation de cette protéine stabilisatrice du RyR2 (Brillantes et al. 1994) qui facilite le couplage entre les RyR2

d'une même unité fonctionnelle de libération de Ca^{2+} , a pour conséquence l'apparition d'états de sous-conductance et d'une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal par augmentation de sa sensibilité à l'activation dépendante du Ca^{2+} (Brillantes et al. 1994 ; Kaftan et al. 1996 ; Marx et al. 2000). Si ce schéma a été validé par de nouvelles études du même groupe notamment par l'utilisation de modèles présentant une délétion du gène codant pour la FKPB12.6 ou de modèles pathologiques (Wehrens et al. 2003 ; Wehrens et al. 2004 ; Wehrens et al. 2005), il est cependant contredit par les études de plusieurs autres groupes qui se sont également intéressés aux mécanismes de dérégulation pathologique de l'activité du RyR2. Ainsi, des études de différents laboratoires n'ont pas réussi à montrer cette hyperphosphorylation du RyR2 au niveau de la Ser 2808 dans des modèles pathologiques (Jiang et al. 2002 ; Xiao et al. 2005), remettant en cause l'hypothèse d'un rôle majeur de la PKA dans l'induction de la fuite de Ca^{2+} du RS (Benkusky et al. 2007 ; MacDonnell et al. 2008 ; Guo et al. 2010) et ce malgré la confirmation d'une participation de la calstabile 2 dans la stabilisation du RyR2 en diastole (Loughrey et al. 2004 ; Gellen et al. 2008 ; Zhang et al. 2009). Les résultats d'études menées par le groupe de D. Bers ont permis de proposer un mécanisme alternatif à l'origine de l'hyperactivité du RyR2 observée en IC, incluant un rôle de la PKA, et qui à ce jour semble le plus accepté parmi la communauté scientifique. Si une augmentation de la phosphorylation du RyR2 sur le site spécifique de la PKA (Ser 2808) est bien observée, elle apparaît cependant être plus faible que l'augmentation du degré de phosphorylation du RyR2 par la CaMKII sur son site spécifique (Ser 2815) avec des augmentations situées respectivement entre 30% et 63% et entre 65% et 105% (Ai et al. 2005). De plus, une étude complémentaire réalisée sur des cardiomyocytes de souris invalidées ou non pour le gène codant pour le PLB montre que si la PKA et la CaMKII favorisent toutes les deux une augmentation de la fuite en Ca^{2+} du RS chez les souris contrôles, la PKA ne favorise pas la fuite du RS chez les souris *Plb*^{-/-} contrairement à la CaMKII (Guo et al. 2006). Ces résultats indiquent donc que le rôle de la PKA dans l'induction de la fuite en Ca^{2+} du RS se situe essentiellement au niveau du PLB tandis qu'au niveau du RyR2 c'est la phosphorylation par la CaMKII qui semble jouer un rôle majeur, une surexpression de la CaMKII ayant d'ailleurs été montrée dans un modèle murin IC en comparaison avec les souris contrôles (Wang et al. 2008). S'il a été montré que la CaMKII est activée lors d'une stimulation β -AR, il est aussi à présent bien établi qu'une activation prolongée de la CaMKII conduit à son auto-activation ce qui prolonge son activité de manière indépendante du Ca^{2+} (Baltas et al. 1997). L'implication de la CaMKII dans les processus pathologiques et arythmiques est sujette à de nombreuses études, il est d'ailleurs intéressant

de noter que l'hyper-phosphorylation de RyR2 par la CaMKII induisant une fuite de Ca^{2+} pro-arythmique est un schéma également proposé pour expliquer les arythmies observées dans la fibrillation atriale humaine (Chelu et al. 2009 ; Voigt et al. 2012). Nous avons vu qu'Epac régule le CEC lors d'une stimulation β -AR en activant la CaMKII. Epac a également été décrit comme induisant une fuite du Ca^{2+} du RS (Pereira et al. 2007) pro-arythmique (Hothi et al. 2008) un mécanisme récemment décrit comme β_1 -AR- et Epac2-dépendant (Pereira et al. 2013). Toutefois, la CaMKII ne joue pas uniquement un rôle au niveau du RS. En effet, la phosphorylation du LTCC par la CaMKII, maximale dans le cœur IC (Wang et al. 2008), a été montrée comme ayant un rôle potentialisateur sur son activité, renforçant ainsi l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule *via* le courant $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ dont l'amplitude est augmentée et l'inactivation ralentie, ce qui concourt à la surcharge Ca^{2+} du cardiomyocyte et aux arythmies (Koval et al. 2010). La somme de tous ces effets va donc aboutir à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le cytoplasme qui peut alors activer d'autres RyR2 qui vont provoquer des vagues calciques spontanées (VCS) se propageant le long de la cellule par le phénomène de CICR.

Il y a cependant une notion bien décrite par le groupe de D. Eisner qui est très importante à souligner : la charge et la fuite sont des mécanismes intimement liés. Comme décrit plus tôt dans cette introduction, l'activité du RyR2 est régulée par sa sensibilité au Ca^{2+} à la fois du côté cytoplasmique (activation par un influx Ca^{2+} provenant de l'ouverture des LTCC) et luminal (sortie de Ca^{2+} favorisée par une charge importante du RS). Ainsi, une fuite de Ca^{2+} *via* les RyR2 et les VCS associées ne peuvent se produire qu'à partir d'un certain seuil de charge en Ca^{2+} du RS (Venetucci et al. 2007). Ce mécanisme a pu être transposé à un cas de pathologie proarythmique : les souris CPVT présentant une mutation du gène codant pour le RyR2 associée à la maladie ne présentent de VCS que lors d'une augmentation de la charge en Ca^{2+} du RS consécutive à une stimulation β -AR (Kashimura et al. 2010). Cette notion d'interdépendance de la charge et de la fuite en Ca^{2+} du RS place les mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique, et en particulier des quantités de Ca^{2+} luminal et cytoplasmique par les activités conjuguées du NCX, de la SERCA2a et du LTCC, au cœur des mécanismes pro-arythmiques (pour revues : Venetucci et al. 2007 ; Eisner et al. 2009).

Les processus pro-arythmiques semblent donc faire intervenir à la fois la protéine kinase régulant majoritairement le CEC en conditions de stress modéré : la PKA (activation de la CaMKII par potentialisation du cycle du Ca^{2+} , rôle au niveau du PLB important dans l'augmentation de la charge en Ca^{2+} du RS), mais aussi une autre protéine kinase dont

l'activité et l'expression ont été reliées dans de nombreuses études à des états pathologiques pro-arythmiques : la CaMKII (surcharge en Ca^{2+} du cardiomyocyte par l'augmentation de l'activité des LTCC et des RyR2 en diastole) (pour revue : Vincent et al. 2014). Ce mécanisme pro-arythmique faisant intervenir la CaMKII a d'ailleurs été étayé par une étude montrant que les VCS observées dans des myocytes de lapins IC sont abolies par un inhibiteurs de CaMKII mais pas par un inhibiteur de PKA lorsqu'on se place à charge en Ca^{2+} du RS constante (Curran et al. 2010), des effets proarythmiques également décrits très récemment chez l'Homme (Fischer et al. 2013 ; Fischer et al. 2014). Ces phénomènes de fuite de Ca^{2+} du RS et, à plus grande échelle, de VCS sont pro-arythmiques puisqu'en augmentant le fonctionnement du NCX pour faire sortir le Ca^{2+} de la cellule, ils induisent la genèse d'un courant dépolarisant électrogénique de Na^+ (I_{ti}) qui déstabilise le potentiel membranaire de la cellule : on parle de post-dépolarisation tardive ou DAD (*delayed after-depolarization*) (**Figure 21**). Si la dépolarisation de la membrane atteint le seuil de déclenchement du PA, ceci entraîne la survenue d'une activité déclenchée qui peut se propager au sein du tissu cardiaque et provoquer une arythmie cardiaque potentiellement mortelle (pour revue : Pogwizd et Bers 2004).

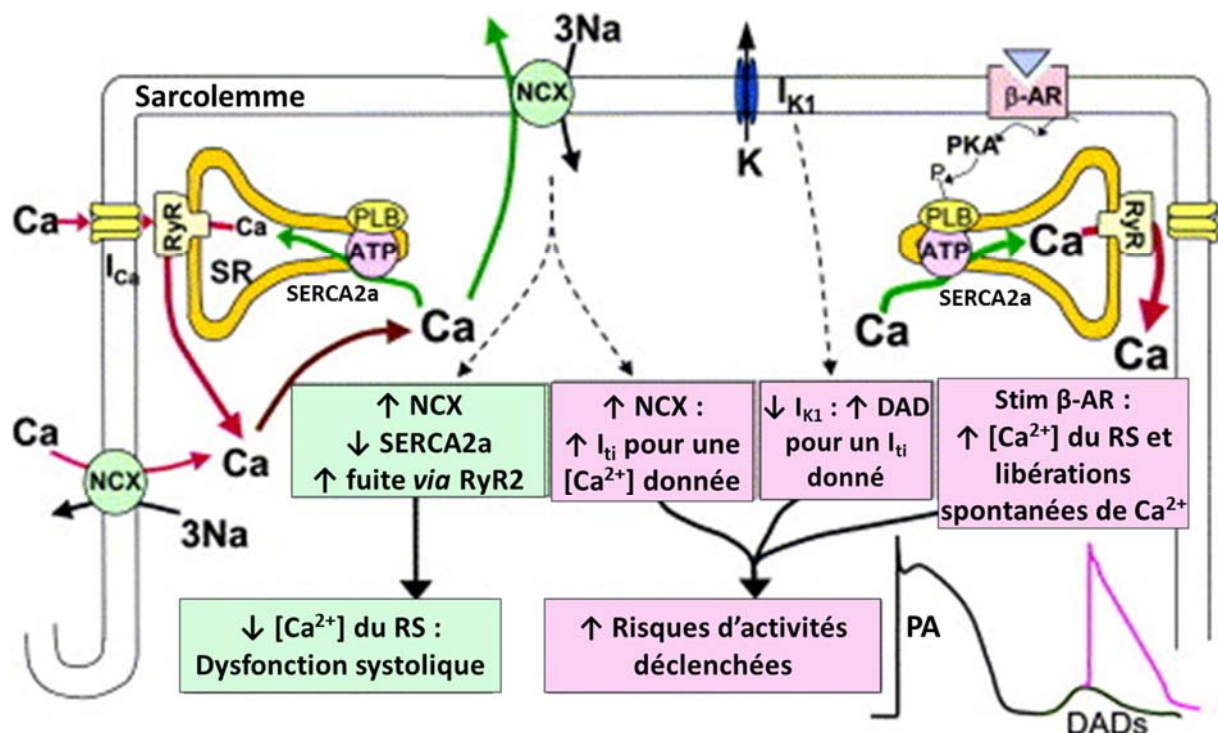


Figure 21 : Perturbations de l'homéostasie Ca^{2+} , DADs, arythmies et pathologie : rôles du NCX, de I_{K1} et des effets d'une stimulation $\beta\text{-AR}$ sur l'activité de la SERCA2a

PA : potentiel d'action, ATP : adénosine triphosphate, DAD : post-dépolarisation tardive (*delayed afterdepolarization*), PKA : protéine kinase A, RyR : récepteur à la ryanodine, RS : réticulum sarcoplasmique. (Adapté de Pogwizd et Bers 2004)

Comme nous l'avons vu précédemment, la capacité d'adaptation du CEC lors d'une stimulation β -AR repose sur la compartimentation des signaux AMPc (Jurevicius et Fischmeister 1996) ce qui permet une action ciblée aux niveaux spatial et temporel de la PKA et de la CaMKII sur les principales cibles impliquées dans la régulation du CEC : les récepteurs β -AR, le LTCC, le PLB, le RyR2 et les protéines contractiles. Cette compartimentation des signaux AMPc dépend principalement, de la co-localisation de ces protéines régulatrices du CEC avec les protéines kinases activatrices et les facteurs limitants que sont les phosphatases (Heijman et al. 2013) et les PDE (Mika et al. 2012). Comme évoqué lors des chapitre précédents, les PDE3 et PDE4 jouent un rôle prépondérant dans la régulation des signaux AMPc chez le rongeur (Mika et al. 2013). De nombreuses études ont montré qu'une diminution de l'expression ou de l'activité de ces PDE entraîne une dérégulation du CEC. C'est notamment le cas des souris qui présentent une délétion du gène codant pour la PDE4B ou pour la PDE4D dont la dérégulation du CEC a été associée à une susceptibilité accrue à la tachycardie ventriculaire et aux arythmies en conditions de stress catécholaminergique (Lehnart et al. 2005 ; Leroy et al. 2011) mais aussi chez l'Homme où la fibrillation atriale a pu être associée à une diminution du niveau d'activité des PDE4 (Molina et al. 2012). Une perte de la spécificité de localisation de l'activité des PDE a également été associée à une dérégulation du CEC par le groupe de V. Nikolaev (Sprenger et al. 2015). Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que, lors de la progression de la pathologie, l'activité de dégradation de l'AMPc par les PDE est réduite de manière significative dans les modèles animaux hypertrophiés ou souffrant d'IC décompensée lesquels meurent de l'aggravation de la défaillance cardiaque ou d'arythmies, ce qui souligne le rôle important des PDE dans la dérégulation du CEC et l'aggravation de la pathologie (Abi-Gerges et al. 2009 ; pour revue : Osadchii 2007). Afin d'améliorer la fonction cardiaque, le traitement des patients atteints d'IC a pendant longtemps reposé sur des inhibiteurs de PDE telle la milrinone (inhibe préférentiellement les PDE3, mais touche également les PDE4 (Bethke et al. 1992 ; Shakur et al. 2002)), cependant, celle-ci est à présent contre-indiquée dans le traitement chronique de l'IC car si cet inhibiteur de PDE3 et 4 permet en effet d'améliorer la fonction cardiaque, il induit un phénomène de mort cellulaire par apoptose (Ding et al. 2005 ; Ding et al. 2005 ; Oikawa et al. 2013) et il entraîne également la survenue d'arythmies fatales pour le patient (Packer et al. 1991). A ce jour, la milrinone est toujours utilisée comme cardiostimulant, mais uniquement pour stimuler le cœur fatigué de patients en attente de greffe cardiaque pour une période inférieure à cent jours (Assad-Kottner et al. 2008) et en tant que traitement de dernier recours de l'IC aigüe (McMurray et al. 2012).

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Si de nombreuses études ont été consacrées au rôle des différentes familles de PDE dans le cœur de mammifère, notamment les PDE3 chez l'Homme (utilisation d'inhibiteurs de PDE3 comme cardio-stimulants) et les PDE4 chez le rongeur (en particulier, la fonction de différentes isoformes au niveau du LTCC et du RyR2), les contributions respectives des différentes familles à la régulation du CEC n'était pas clairement établie. Dans une première partie de ma thèse, j'ai contribué à préciser le rôle des PDE2, PDE3 et PDE4 dans la modulation du CEC cardiaque. Nous avons pour cela réalisé une étude pharmacologique sur les transitoires Ca^{2+} et la contraction cellulaire et mesuré en parallèle la phosphorylation par la PKA des protéines clés du CEC (LTCC, RyR2, TnI, MyBPc et PLB). L'implication éventuelle de la CaMKII dans les effets observés des inhibiteurs de PDE sur le CEC a également été étudiée.

Comme détaillé dans la partie introductive, plusieurs études font état de la survenue d'arythmies lorsque l'activité des PDE est diminuée. En effet, si des inhibiteurs de PDE3 sont toujours utilisés comme cardiostimulants dans le traitement de l'IC aigüe, leur utilisation est limitée par la survenue d'arythmies pouvant être fatales pour le patient (Packer et al. 1991). De plus, si les effets pro-arythmiques d'une invalidation des gènes codant pour les PDE4 chez la souris sont connus (Lehnart et al. 2005 ; Leroy et al. 2011), les mécanismes cellulaires sous-jacents restent à préciser. Le second et principal objectif de mon travail de thèse a donc été de caractériser les arythmies induites par l'inhibition des principales familles de PDE ainsi que les mécanismes cellulaires impliqués. Pour cela, nous avons d'abord caractérisé les arythmies induites par l'inhibition des PDE4 dans des cardiomyocytes isolés de cœurs de rat grâce à l'enregistrement de potentiels d'action par la technique de patch clamp. Nous avons ensuite caractérisé les mécanismes cellulaires sous-jacents par l'étude de la contraction cellulaire et des transitoires Ca^{2+} en présence d'inhibiteurs des deux principales familles de PDE chez le rongeur, les PDE3 et PDE4. Enfin, nous avons précisé les voies de signalisation impliquées dans ces processus pro-arythmiques par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des principaux acteurs de ces voies : la PKA, Epac et la CaMKII.

Les PDE4 constituent la principale famille de PDE impliquée dans la dégradation de l'AMPc produits lors de stimulations β -AR chez le rongeur et sont également exprimées chez l'Homme. Nous nous sommes par conséquent demandé si les résultats obtenus chez le rat

pouvaient être transposés dans un modèle présentant une physiologie cardiaque plus proche de la physiologie humaine. Pour cela j'ai étudié les effets de l'inhibition des PDE3 et PDE4 dans un modèle porcin. J'ai d'abord déterminé la part relative des PDE3 et des PDE4 dans la dégradation des signaux AMPc en utilisant un biosenseur de l'AMPc basé sur le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET). Puis, j'ai étudié les effets pro-arythmiques ainsi que les perturbations de l'homéostasie Ca^{2+} induits par l'inhibition des PDE3 et des PDE4 dans ce modèle par la mesure simultanée de la contraction cellulaire et des transitoires Ca^{2+} . Enfin, j'ai déterminé l'implication de la CaMKII dans les mécanismes aboutissant aux perturbations de l'homéostasie Ca^{2+} à l'origine des arythmies observées dans ce modèle.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Modèles animaux

A. Rats adultes

Le modèle de rats adultes utilisés dans notre étude est le rat Wistar (Janvier, Le Genest St Isle, France). Les rats Wistar sont une souche polyvalente de rats albinos, sélectionnés par Donaldson en 1906 au Wistar Institute (USA). Ils présentent une croissance moyenne et sont faciles à manipuler. Ils appartiennent à l'espèce *Rattus norvegicus*. Ces rats sont hébergés sur la plateforme « Animalerie et exploration fonctionnelle » de l'IFR 141 (Châtenay-Malabry, France).

B. Cochons

Le modèle de cochon utilisé dans notre étude est le cochon Landrace. Les cochons Landrace sont des cochons domestiques d'élevage qui présentent de bonnes capacités de croissance, le mâle adulte pouvant atteindre un poids de 350 kg. Ils appartiennent à l'espèce *Sus scrofa domesticus*. Ces cochons sont hébergés à l'animalerie du Centre Chirurgical Marie-Lannelongue (Le Plessis-Robinson, France).

II. Isolement des cardiomyocytes et culture cellulaire primaire

Toutes les expériences ont été réalisées de façon conforme au *European Community guiding principles* (2010/63/UE, 22 septembre 2010), avec l'utilisation du guide de comité d'éthique (CREEA Ile-de-France Sud), et conformément au décret français n° 2013-118 du 1^{er} février 2013 (Journal Officiel de la République Française n°0032, 1^{er} février 2013, pp. 2199, texte n°24). Les autorisations pour effectuer les expériences ont été obtenues auprès de Ministère français de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt (n°B92-019-01).

A. Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

1. Dissociation du cœur

Le rat Wistar mâle (250-300 g) est anesthésié par injection intra-péritonéale de Pentobarbital (0,1 mg/g) et placé en décubitus dorsal. Après thoracotomie, le cœur est rapidement prélevé et plongé dans la solution filtrée de lavage froide A (**Table 1**), afin de le rincer de son sang et d'arrêter les battements cardiaques. Il est ensuite très rapidement canulé par son aorte sur un système de perfusion rétrograde de type Langendorff placé sous hotte à flux laminaire, et lavé pendant quatre minutes.

La dissociation des cardiomyocytes ventriculaires est possible grâce à la perfusion d'une solution physiologique enzymatique dans le cœur par les coronaires (perfusion rétrograde). Tous les territoires cardiaques sont ainsi atteints et la matrice extracellulaire correctement digérée, sans toutefois altérer la membrane des cellules qui conservent ainsi leur intégrité.

La procédure se fait en deux étapes en utilisant deux solutions filtrées constamment oxygénées et maintenues à 37°C grâce à un bain-marie thermostaté : le cœur est tout d'abord perfusé par la solution de lavage A pendant quatre minutes à un débit constant de 4 mL/min, imposé par une pompe péristaltique, permettant ainsi d'éliminer le sang restant dans le système coronarien et dans les cavités cardiaques. Il est ensuite digéré par une solution enzymatique B (**Table 1**) contenant la collagénase A (1 mg/mL) (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) et 20-25 μM de calcium libre pendant 45 min à un débit de perfusion de 4 mL/min.

A la fin de la digestion, les deux ventricules sont disposés dans la solution C filtrée (**Table 1**) contenant 20-25 μM de calcium et sont séparés des oreillettes qui sont alors éliminées. Les ventricules sont finement découpés et la dissociation mécanique permet de libérer les cellules du ventricule dans le milieu. Le mélange est passé sur filtre et mis à décanter à 37°C. Le culot obtenu est resuspendu dans la solution C et placé sous agitation lente (80 rpm). La remontée calcique s'effectue par paliers, d'abord avec 70-75 μM de Ca^{2+} puis 320-325 μM de Ca^{2+} par ajout de CaCl_2 . Après décantation, le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans la solution D filtrée (**Table 1**) contenant 300 μM de Ca^{2+} et 5 mg/mL de sérum d'albumine bovine (BSA), celle-ci permet de séparer les cellules mortes des vivantes par décantation pendant 10 min. Cette étape est répétée une seconde fois avant de

suspendre le culot cellulaire soit dans une solution physiologique D' (**Table 1**) contenant 1 mM de Ca^{2+} pour les expériences de patch clamp, soit dans le milieu de culture M1 (**Table 2**) contenant 1,2 mM de Ca^{2+} pour les autres expériences. Cette remontée calcique progressive permet d'atteindre 1,8 mM de Ca^{2+} en évitant une surcharge des myocytes en Ca^{2+} .

	Solutions (en mM)				
	A	B	C	D	D'
NaCl	117	117	117	117	117
KCl	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
NaHCO₃	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
KH₂PO₄	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
MgCl₂	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
HEPES	21	21	21	21	21
Glucose	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7
Créatine	10	10	10	10	10
Taurine	20	20	20	20	20
Collagénase A	-	1 mg/mL	-	-	-
EGTA	-	0,307	-	-	-
Ca²⁺ libre	-	0,02 - 0,025	0,02 - 0,025	0,3	1
BSA	-	-	-	5 mg/mL	-
pH 37°C	7,1	7,1	7,1	7,6	7,6
Pénicilline - Streptomycine	-	-	-	-	1%

Table 1 : Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

La concentration en Ca^{2+} libre est ajustée pour chaque solution considérée par ajout de CaCl_2 (1 M, Sigma Aldrich) et mesurée par une électrode à Ca^{2+} préalablement étalonnée.

2. Culture des cardiomyocytes ventriculaires

Les cellules sont maintenues en culture dans un milieu (MEM : M4780 ; Sigma, Saint-Louis, MO, USA) enrichi en acides aminés, vitamines, sels inorganiques et glucose. Les cellules en suspension dans le milieu M1 (**Table 2**) sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez puis réparties dans des boîtes de Pétri, préalablement traitées avec 10 $\mu\text{g/mL}$ de laminine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) afin de permettre l'adhésion des

cardiomyocytes, à raison de 10 000 cellules par boîte de 35 mm de diamètre pour les expériences de physiologie et 200 000 cellules par boîte de 50 mm de diamètre pour les expériences de biochimie. Les boîtes de 35 mm de diamètre ont été modifiées au laboratoire afin de réduire leur contenance à 300 μ L, en perçant leur fond et en collant une lamelle de verre couvre-objet. Les cellules sont placées dans un incubateur en atmosphère 95% O₂, 5% CO₂ et à 37°C. Après 1h d'incubation, lorsque les cellules ont adhéré au fond des boîtes, le milieu M1 est remplacé par 300 μ L de milieu M2 (**Table 2**) sans sérum de veau fœtal (SVF). Toutes les expériences ont été réalisées après au moins 1h de déprivation du SVF.

	Milieu M1	Milieu M2
Milieu MEM	Oui	Oui
CaCl ₂	1,2 mM	1,2 mM
SVF	2,5%	-
HEPES	2%	2%
Pénicilline - Streptomycine	1%	1%
pH 37°C	7,6	7,6

Table 2 : Composition des milieux de culture utilisés pour la culture de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte et de cochon

B. Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de cochon

Les cochons âgés de six mois (poids de 37 kg à 40 kg) sont tranquilisés par une injection intramusculaire de kétamine hydrochloride (15 mg/kg) puis anesthésiés par injection intraveineuse de propofol 1% et de cisatracurium (0,3 mg/kg toutes les 2h) et intubés pour permettre le maintien de l'anesthésie par un mélange d'isoflurane et d'oxygène 100% (Servo 900, Siemens-Elema AB, Solna, Suède). Après thoracotomie, l'animal est sacrifié par exsanguination (incision au niveau d'une oreillette), le cœur est rapidement prélevé et plongé dans une solution de sérum physiologique à +4°C afin de le rincer de son sang et d'arrêter les battements cardiaques. Il est ensuite rapidement canulé au niveau de l'ostium de l'artère coronaire droite sur un système Langendorff de perfusion rétrograde, et lavé pendant 15 min avec une solution tampon Krebs-BSA 0,5% (**Table 3**) à un débit de 800 mL/min. La digestion tissulaire s'effectue par ajout d'un mélange enzymatique composé de 3,354 UI/mL de collagénase A et de 6UI/mL de protéase type XXIV (Sigma) à la solution physiologique (**Table 3**) qui est perfusée dans le ventricule droit avec un débit diminué à 200 mL/min.

Après 15 à 20 min de perfusion de la solution enzymatique, le cœur est rincé par une solution tampon HEPES-BSA 2% (**Table 3**), puis le ventricule droit est récupéré, les tissus conducteurs sont retirés, et des bandes de tissu de l'endocarde et du myocarde sont collectées. Les échantillons de tissu sont alors dissociés mécaniquement, filtrés, les cellules vivantes sont séparées des cellules mortes par sédimentation, puis les culots cellulaires sont successivement resuspendus dans des aliquots de milieu de culture M1 à concentrations de Ca^{2+} croissantes : 0 mM, 0,3 mM, 0,6 mM et 1,2 mM. Les cellules sont ensuite comptées sur cellule de Malassez puis distribuées dans des boîtes de culture dans le milieu de culture M1 à raison de 10 000 cellules par boîte. Après l'adhésion des cellules au fond des boîtes, le milieu M1 est remplacé par 300 μL de milieu M2 (**Table 2**) sans sérum de veau fœtal (SVF). Toutes les expériences ont été réalisées après au moins 1h de déprivation du SVF.

	Solutions (en mM)		
	Solution Krebs-BSA 0,5%	Solution enzymatique	Solution HEPES-BSA 2%
NaCl	35	35	130
KCl	4,8	4,8	4,8
KH₂PO₄	1,2	1,2	1,2
Glucose	10	10	5
Sucrose	134	134	-
Na₂HPO₄	15,9	15,9	-
NaHCO₃	25	25	-
HEPES	10	10	25
BSA	0,5%	0,5%	2%
Collagénase A	-	0,354 UI/mL	-
Protéase XXIV	-	6 UI/mL	-
pH à 37°C (équilibre)	7,4 (carbogène)	7,4 (carbogène)	7,4 (oxygène)

Table 3 : Composition des solutions nécessaires à la dissociation de cardiomyocytes ventriculaires de cochon

C. Infection adénovirale

Les cellules sont infectées par l'adénovirus d'intérêt solubilisé dans du milieu de culture M2 :

- Ad-AKAR3-NES (*A kinase activity reporter-nuclear export sequence*) (Allen et Zhang 2006) codant pour une séquence consensus substrat de la PKA flanquée des fluorophores CFP et YFP, rapporteur de l'activité PKA dans la cellule. Lorsque l'activité de la PKA augmente le senseur se replie et le FRET augmente. Utilisé sur des cardiomyocytes de rat.
- Ad-H187 (*cAMP sensor*) (Klarenbeek et al. 2011 ; Klarenbeek et al. 2015). Cette sonde, codant pour le domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac flanqué des fluorophores mTurquoise et de deux Venus, permet de mesurer les taux d'AMPc intracellulaire : le FRET diminue lorsque la concentration d'AMPc augmente. Utilisé sur des cardiomyocytes de cochon.
- Ad-PKI (*PKA Inhibitor*) codant pour le peptide inhibiteur PKI de la PKA (Lum et al. 1999). Utilisé sur des cardiomyocytes de rat.
- Ad- β -galactosidase, codant pour la β -galactosidase, est une construction commerciale (Cell Biolabs, Inc, USA). Elle est utilisée sur des cardiomyocytes de rat en tant que condition contrôle en parallèle de l'Ad-PKI.

Les adénovirus sont utilisés à différentes concentrations selon leur capacité d'infection et la durée d'infection. Le nombre de particules virales actives par cellule définit la MOI (multiplicité d'infection). Pour un virus donné, la MOI optimale est la MOI minimale permettant d'obtenir une expression de la sonde dans pratiquement 100% des cellules. Dans notre système, les cardiomyocytes de rat adulte sont infectés avec une MOI 200 pour l'Ad-AKAR3-NES (expression à 48h), MOI 1000 pour l'Ad-PKI et pour l'Ad- β -galactosidase (expression à 24h). Les cardiomyocytes de cochon sont infectés avec une MOI 1000 pour l'Ad-H187 (expression à 26h). Les myocytes sont gardés en culture 24 à 48 heures en absence de sérum afin de minimiser les effets de la dédifférenciation cellulaire. Après l'infection, les cellules possèdent toujours leur aspect typique en « brique » et une striation apparente.

III. Mesure de la transitoire Ca^{2+} , du raccourcissement cellulaire, de la fuite et de la charge de Ca^{2+} du RS

A. Principe

Le système photométrique IonOptix (IonOptix, Milton, MA, USA) est utilisé pour des mesures combinées de fluorescence et de contractilité, à l'aide d'une caméra CD (*charge coupled*, Device CCD, IonOptix, Myocam CCD100M) et de tubes photomultiplicateurs. Ce système permet d'enregistrer simultanément le raccourcissement des sarcomères, unité contractile du cardiomyocyte, et la variation de Ca^{2+} intracellulaire grâce à la sonde fluorescente sensible au Ca^{2+} Fura-2. Ainsi, on peut suivre en temps réel les transitoires Ca^{2+} et les contractions de la cellule stimulée électriquement (fréquence : 1 Hz, intensité : 5 V, durée de l'impulsion : 4 ms).

B. Sonde Fura-2 AM

L'indicateur calcique utilisé est le Fura-2 AM (ester d'acétoxyméthyl de Fura-2, Invitrogen) qui est préalablement solubilisé dans une solution d'acide pluronique 20%. Les cellules sont chargées avec le Fura-2 AM dilué à la concentration de 1 μM dans un milieu de Ringer K^+ , pendant 15 minutes à température ambiante puis rincées dans un milieu de Ringer K^+ (**Table 4**). Le Fura-2 AM diffuse passivement à travers la membrane. Une fois dans la cellule, les estérases intracellulaires permettent de cliver l'ester et de libérer l'indicateur fluorescent. Le Fura-2 est une sonde ratiométrique double excitation (340 et 380 nm)/mono émission (512 nm) (**Figure 22**). Sa constante de dissociation pour le Ca^{2+} est de 0,14 μM .

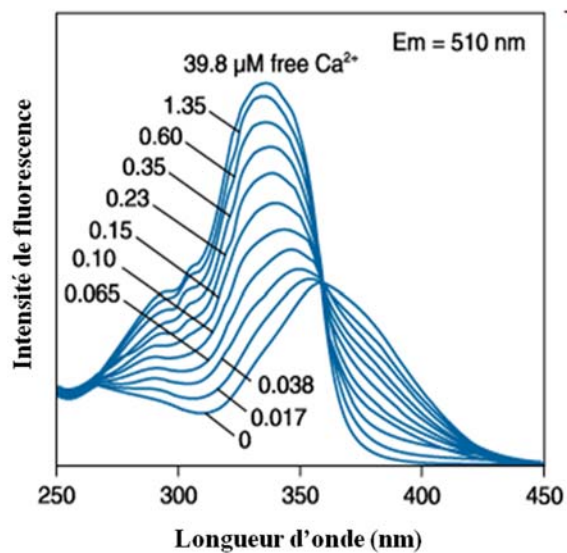


Figure 22 : Spectre d'excitation du Fura-2 : double excitation/mono émission

C. Solutions

Quatre solutions différentes sont utilisées dans les expériences de IonOptix selon les protocoles utilisés pour la mesure de la transitoire Ca^{2+} et du raccourcissement cellulaire seuls, ou également de la fuite et de la charge de Ca^{2+} du RS (**Table 4**).

	Solutions (en mM)			
	Ringer K ⁺	Ringer 0Na ⁺ /0Ca ²⁺	Ringer 0Na ⁺ /0Ca ²⁺ + tétracaïne	Ringer 0Na ⁺ /0Ca ²⁺ + caféine
HEPES	10	10	10	10
NaCl	121,6	-	-	-
LiCl	-	121,6	121,6	121,6
Glucose	5	5	5	5
Na Pyruvate	5	-	-	-
Li Pyruvate	-	5	5	5
NaHCO ₃	4,013	-	-	-
Li ₂ CO ₃	-	4,013	4,013	4,013
Na ₂ HPO ₄	0,8	-	-	-
LiH ₂ PO ₄	-	0,8	0,8	0,8
KCl	5,4	5,4	5,4	5,4
CaCl ₂	1,8	-	-	-
MgCl ₂	1,8	1,8	1,8	1,8
pH à 21°C	7,4 (NaOH)	7,4 (LiOH)	7,4 (LiOH)	7,4 (LiOH)
Tétracaïne	-	-	1	-
Caféine	-	-	-	10

Table 4 : Composition des solutions de Ringer utilisées dans les expériences de mesure de la transitoire Ca²⁺, du raccourcissement cellulaire, de la fuite et de la charge de Ca²⁺ du RS

La solution Ringer K⁺ est utilisée pour les expériences de mesure de la transitoire Ca²⁺ et du raccourcissement cellulaire, les trois autres solution 0Na⁺/0Ca²⁺ ± activateur/inhibiteur de RyR2 sont utilisées pour les expériences de mesure de la fuite et de la charge de Ca²⁺ du RS.

D. Installation

L'observation de l'échantillon se fait par un microscope à épifluorescence (Nikon DIAPHOT 300). Les cardiomyocytes présentent une striation nette et au microscope (objectif à immersion à huile de grossissement X40), la longueur d'un sarcomère correspond à la distance entre le milieu d'une bande claire et le milieu de la suivante. Les cellules sont électriquement stimulées par pulses biphasiques (5 V, 4 ms) à une fréquence de 1 Hz grâce à une fourche en platine reliée à un stimulateur électrique. Une caméra CCD, reliée au microscope, permet de suivre les changements morphologiques rapides d'une cellule isolée en capturant 240 images par seconde (**Figure 23**). Elle présente un contrôle des contrastes et

une grande sensibilité. Le système d'illumination (lampe Xénon, Xenon Short Arc lamp, Ushio, Saint-Ouen-L'Aumône, France) est équipé d'un miroir oscillant («*HyperSwitch*») entre les deux longueurs d'onde d'excitation du Fura-2 340 et 380 nm. La lumière transmise présente un filtre rouge ce qui permet de mesurer simultanément la fluorescence et la longueur des sarcomères. Un miroir dichroïque à 585 nm permet d'envoyer la fluorescence (<585 nm) vers le photomultiplicateur (PM) et la lumière transmise (rouge, >585 nm) vers la caméra (**Figure 24**). Le PM fournit un signal électrique proportionnel à l'intensité lumineuse de l'émission aux deux longueurs d'onde d'excitation du Fura-2. Le système permet de mesurer l'intensité de chaque longueur d'onde à une fréquence de 250 Hz. Il est piloté par le logiciel IonWizard 6.4 (IonOptix) (**Figure 23**).

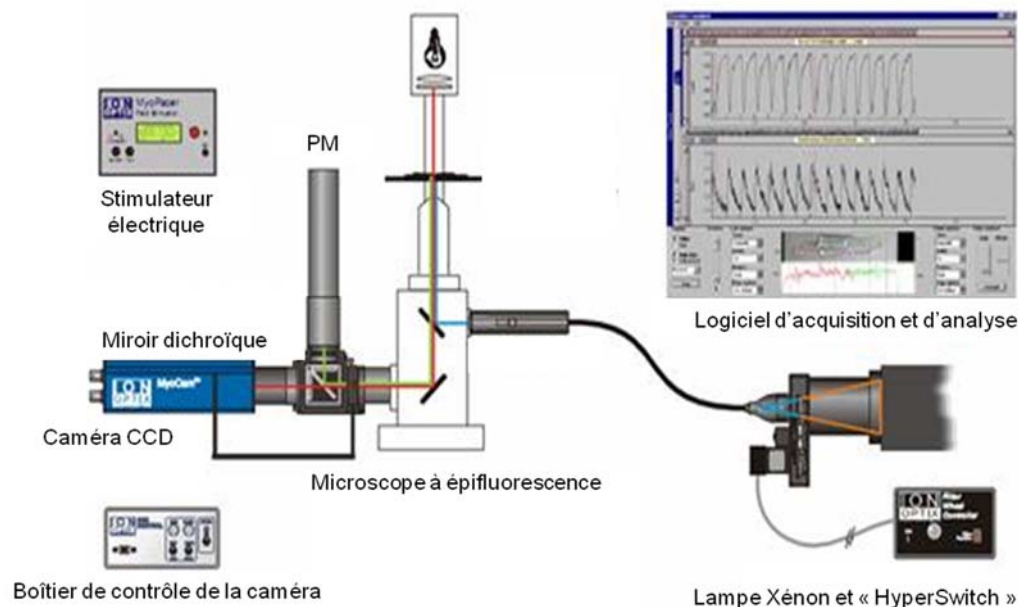


Figure 23 : Schéma de l'installation du système IonOptix

(modifié d'après www.bio-equip.com)

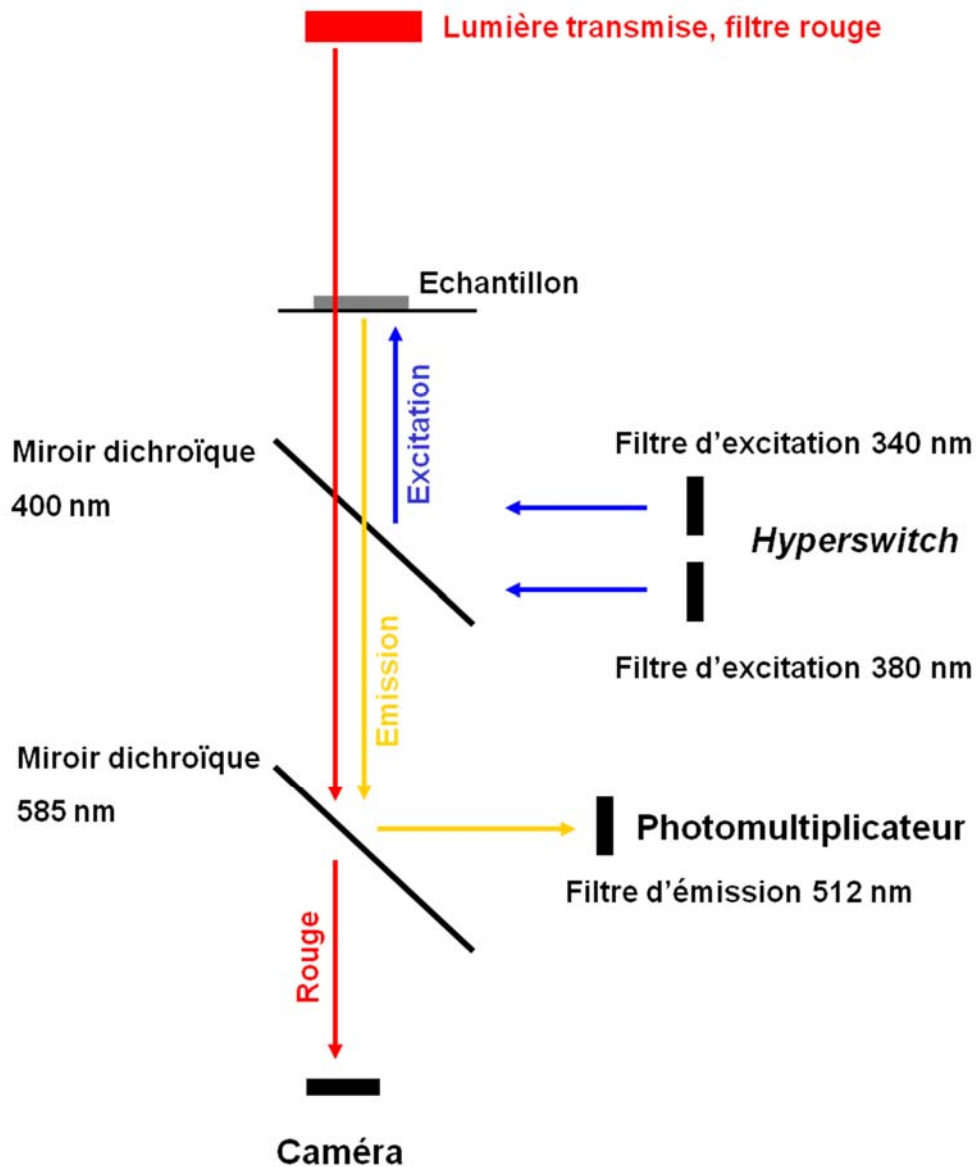


Figure 24 : Montage expérimental permettant la mesure de Ca^{2+} avec la sonde Fura-2

L'excitation à 340 et 380 nm est renvoyée vers l'échantillon par un miroir dichroïque (400 nm). La lumière transmise et l'émission de fluorescence passent à travers ce miroir et sont séparées par un deuxième miroir dichroïque (585 nm). La fluorescence est renvoyée par un miroir dichroïque (585 nm) vers un filtre d'émission à 512 nm avant d'arriver sur le photomultiplicateur.

E. Mesure des transitoires Ca^{2+} , du raccourcissement cellulaire, de la charge et de la fuite de Ca^{2+} du RS

Toutes les expériences effectuées sur les cardiomyocytes de rat (ARVM pour *adult rat ventricular myocytes*) sont réalisées à température ambiante contrôlée ($21 \pm 1^\circ\text{C}$).

Les transitoires Ca^{2+} et le raccourcissement cellulaire des ARVM sont enregistrés en solution de Ringer K^+ sur des myocytes stimulées par des pulses biphasiques (5 V, 4 ms) à une fréquence de 1 Hz. Dans chaque condition expérimentale, après que les transitoires Ca^{2+} aient atteint une amplitude stable, une pause de 10 s sans stimulation électrique est effectuée pour permettre l'observation de la survenue de VCS. Comme la survenue d'arythmies dépend également de la qualité initiale des cellules, les cardiomyocytes présentant des VCS sous la perfusion de solution de Ringer contrôle ont été éliminées.

La mesure de la charge et de la fuite de Ca^{2+} du RS a été réalisée en suivant un protocole dédié inspiré de l'étude de (Shannon et al. 2002). Les ARVM sont stimulés à une fréquence de 1 Hz en Ringer K^+ pendant quelques minutes jusqu'à atteindre une amplitude de transitoires Ca^{2+} et de raccourcissement cellulaire constants. Directement après la dernière stimulation électrique, la solution perfusée est changée pour une solution de Ringer $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ dans laquelle le Na^+ est remplacé par du lithium (Li^+). Cette condition permet de mesurer les niveaux de Ca^{2+} intracellulaires dans un système fermé en interdisant les flux trans-sarcolemmaux de Na^+ et de Ca^{2+} . Après 30 s de perfusion de la cellule avec la solution $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$, la cellule est à nouveau perfusée par une solution de Ringer K^+ et stimulée électriquement jusqu'à retrouver une amplitude de transitoires Ca^{2+} et de raccourcissement cellulaire constants. Les stimulations électriques sont alors à nouveau stoppées et, directement après la dernière impulsion électrique, la solution perfusée est changée pour une solution de Ringer $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ supplémentée d'un inhibiteur réversible des RyR2 : la tétracaïne à une concentration de 1 mM. La présence de tétracaïne permet d'arrêter la fuite de Ca^{2+} du RS dans le cytoplasme, ce qui permet donc d'estimer la fuite en Ca^{2+} du RS par la différence de fluorescence entre les conditions $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ et $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ +tétracaïne. La tétracaïne est ensuite lavée pendant 1 min, puis une brève application d'une concentration massive de caféine (10 mM) est effectuée afin de provoquer le relargage massif du contenu en Ca^{2+} du RS afin d'estimer la charge en Ca^{2+} du RS.

Toutes les expériences effectuées sur les cardiomyocytes de cochon (APVM pour *adult pig ventricular myocytes*) sont réalisées à température ambiante contrôlée ($37 \pm 2^\circ\text{C}$). La mesure des transitoires Ca^{2+} et du raccourcissement cellulaire des APVM est réalisée selon le même protocole que pour les ARVM.

F. Traitement des données

Le logiciel IonWizard permet de mesurer soit le raccourcissement de la cellule, soit le raccourcissement des sarcomères. Lors de nos expériences, nous avons mesuré le raccourcissement des sarcomères car cette méthode est plus reproductible du fait de la contraction des cellules qui n'est pas toujours parfaitement linéaire. Une région délimitant un ensemble de sarcomères est déterminée par l'expérimentateur sur l'écran de l'ordinateur auquel est relié le système. A partir de cette région d'intérêt, le logiciel fournit un profil de densité, où chaque pixel de l'image représente une valeur qui indique son niveau de gris (0 pour noir, et 255 pour blanc) (**Figure 25**). Du fait de l'alternance régulière des bandes A et I, le profil de densité est périodique. A partir du profil de densité obtenu, le logiciel effectue une transformée de Fourier rapide (TF), permettant de passer dans le domaine fréquentiel (**Figure 25**). Dans le domaine fréquentiel, la longueur d'onde est représentée par un pic qui se déplace vers les fréquences plus élevées lorsque la cellule se contracte. La longueur moyenne des sarcomères présents dans la région d'intérêt est déterminée toutes les $1/240^{\text{èmes}}$ de seconde (vitesse de la caméra). La variation de longueur des sarcomères détermine l'amplitude des contractions cellulaires. Les cellules ayant une longueur de sarcomère inférieure à $1,7 \mu\text{m}$ en condition basale ne sont pas prises en compte car étant contracturées.

L'augmentation de Ca^{2+} dans la cellule se traduit par une augmentation de la fluorescence émise en réponse à une excitation à 340 nm (F_{340}) et une diminution de fluorescence émise en réponse à une excitation à 380 nm (F_{380}). La mesure du rapport de fluorescences F_{340}/F_{380} (R) effectuée par le système 250 fois par seconde, permet d'apprécier la variation de Ca^{2+} intracellulaire simultanément aux variations de longueur des sarcomères (**Figure 25**).

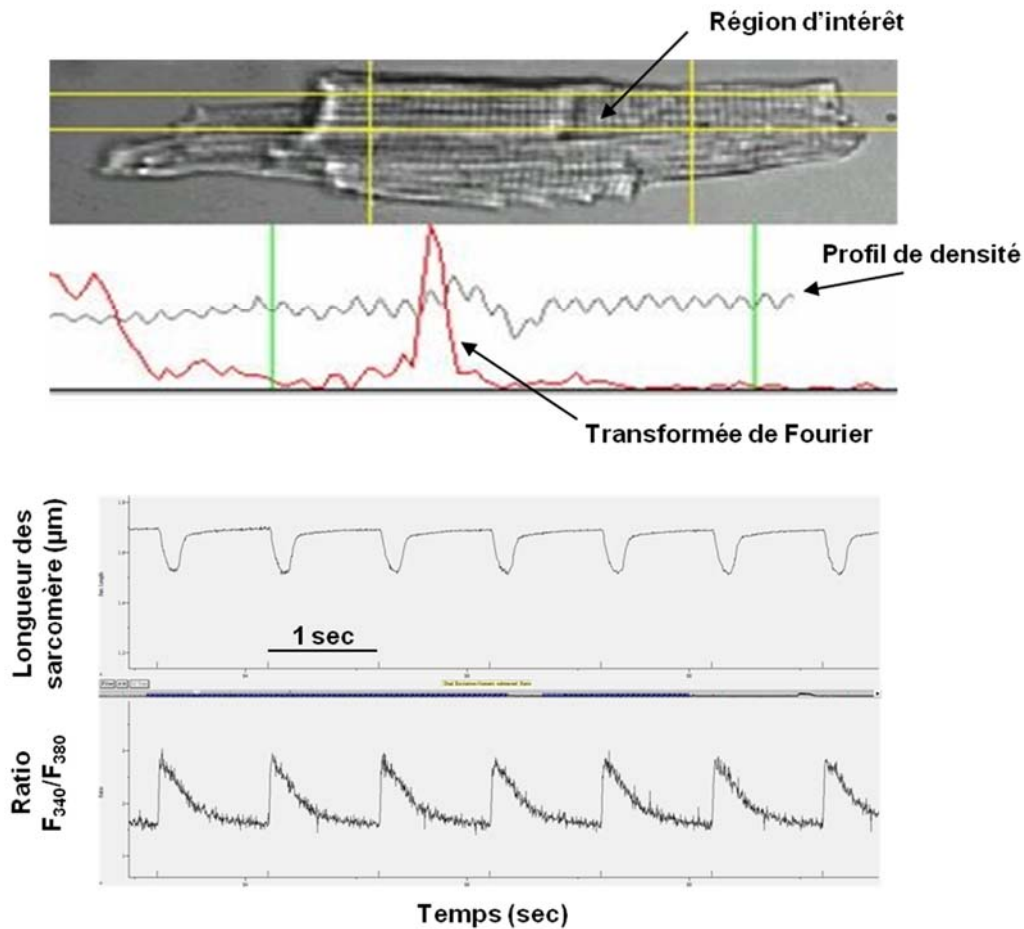


Figure 25 : Mesure simultanée du raccourcissement cellulaire et des transitoires calciques déclenchées par des stimulations électriques (5V, 4 ms) à la fréquence de 1 Hz sur un cardiomyocyte ventriculaire isolé de rat chargé avec 1 μ M de Fura-2 AM.

G. Analyse

Des moyennes de plusieurs transitoires de contraction et de fluorescence calcique (une dizaine quand c'est possible) sont déterminées à l'aide du logiciel d'analyse IonWizard, pour chaque condition testée. Pour chacune des traces moyennes, l'amplitude ainsi que les cinétiques de retour des signaux sont mesurées avec le logiciel (**Figure 26**). Pour le raccourcissement cellulaire, l'amplitude absolue a été mesurée comme la différence entre la longueur des sarcomères en systole et celle en diastole (ΔL). Le pourcentage de raccourcissement cellulaire ($\Delta L\%$) est le rapport entre l'amplitude absolue et la longueur des sarcomères en diastole. ($\Delta R\%$) représente le pourcentage de variation du ratio R. Les

cinétiques de relaxation sont analysées en déterminant le Tau de décroissance (τ) pour chaque trace moyenne en appliquant une régression non-linéaire de la partie décroissante de la transitoire Ca^{2+} ou de la contraction avec l'équation suivante : $X(t) = A \cdot \exp(-(t/\tau)) + A_0$, où t est le temps, A_0 l'asymptote de l'exponentielle et τ la constante de temps de relaxation. τ représente ainsi le temps nécessaire pour retrouver environ 63% de la contraction maximale ou de la fluorescence Ca^{2+} diastolique (**Figure 26**). La moyenne ($\pm \text{SEM}$) des amplitudes et des Tau de décroissance est calculée pour chaque condition testée.

La fuite de Ca^{2+} du RS est déterminée par la différence entre les intensités de fluorescence enregistrées à l'état stable dans les conditions $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ et $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+} + \text{tétracaïne}$ (**Figure 27**). La charge en Ca^{2+} du RS est calculée en divisant l'amplitude du pic de fluorescence induit par l'application de caféine par le ratio de fluorescence diastolique corrigé mesuré directement avant l'application de caféine (**Figure 27**). La correction du ratio de fluorescence diastolique mesuré avant l'application de caféine est effectuée en soustrayant la valeur de la fuite de Ca^{2+} du RS à la valeur du ratio de fluorescence enregistrée.

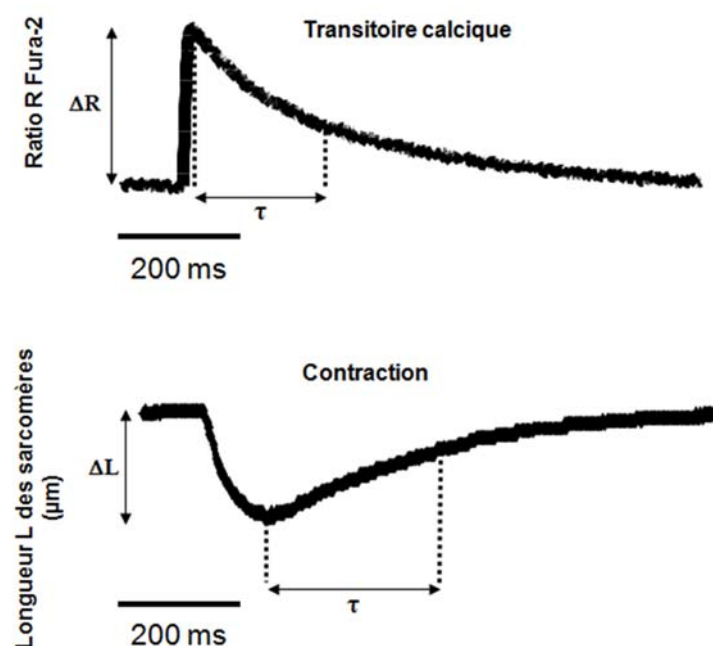


Figure 26 : Détermination des paramètres d'amplitude et de cinétique pris en compte dans l'analyse des signaux de contraction et de transitoire Ca^{2+} .

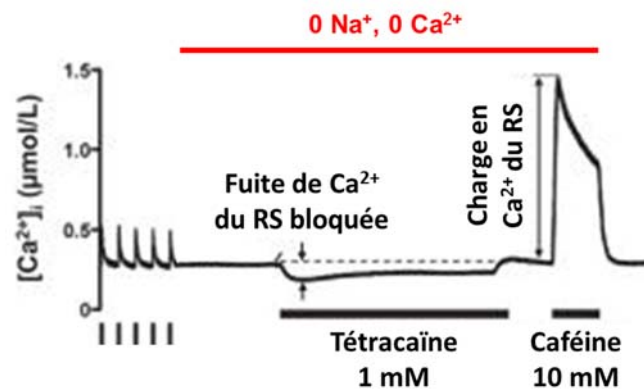


Figure 27 : Détermination de la fuite et de la charge en Ca^{2+} du RS.

(adapté d'après Voigt et al. 2012)

IV. Enregistrement de potentiels d'action

A. Principe

L'enregistrement du potentiel de membrane de cardiomyocytes de rat est réalisé par l'utilisation de la technique de patch clamp, mise au point par Neher et Sakmann (Neher et Sakmann 1976). Premièrement, une partie de la membrane de la cellule est isolée électriquement du reste de la membrane cellulaire par aspiration dans la pipette de patch clamp (le diamètre de l'extrémité de la pipette est d'environ $1\ \mu\text{m}$) jusqu'à ce que la résistance électrique atteigne le giga ohm. En effet, plus cette valeur de résistance est élevée, plus le contact entre la membrane et la pipette est étroit, et plus le rapport courant électrique/bruit de fond est élevé. A partir de cette configuration, nommée « cellule attachée » et pouvant permettre l'enregistrement des courants électriques survenant au niveau de la portion membranaire isolée à l'intérieur de la pipette tout en assurant un maintien de l'intégrité cellulaire, trois autres configurations peuvent être obtenues dont la configuration "cellule entière" qui autorise l'accès au milieu intracellulaire en diffusant le milieu intrapipette à l'intérieur de la cellule. L'enregistrement de potentiels d'action, et plus généralement du potentiel de membrane, s'effectue en mode *current clamp* c'est-à-dire un mode de mesure du potentiel en courant imposé : le potentiel de membrane varie librement en fonction des courants ioniques imposés à la cellule par la pipette de patch clamp.

B. Solutions

Trois solutions différentes sont utilisées dans les expériences de patch clamp pour l'enregistrement des variations du potentiel de membrane (**Table 5**). L'osmolarité de ces solutions est comprise entre 300 mosm et 310 mosm.

	Solution (en mM)		
	Solution intracellulaire	Solution extracellulaire 0 Ca^{2+}	Solution extracellulaire 1,8 mM Ca^{2+}
NaCl	-	140	140
KCl	130	4	4
HEPES	10	10	10
EGTA	0,05	-	-
Glucose	-	10	10
MgCl₂	4,013	1,1	1,1
CaCl₂	-	-	1,8
Na₂-PhosphoCréatine	5	-	-
Na₂-ATP	3,075	-	-
Na-GTP	0,416	-	-
pH à 21°C	7,3 (KOH)	7,4 (NaOH)	7,4 (NaOH)

Table 5 : Composition des solutions utilisées dans les expériences de mesure de PA et du potentiel de membrane de cardiomyocytes ventriculaires de rat adulte

La solution extracellulaire 0 Ca^{2+} est utilisée pour l'approche de la pipette vers la cellule, la solution extracellulaire 1,8 mM Ca^{2+} est utilisée pour réaliser le gigaseal et pendant la réalisation des protocoles expérimentaux.

C. Dispositif expérimental et chaîne d'acquisition

L'observation des cellules lors de l'approche de la pipette d'enregistrement est réalisée en microscopie à transmission à l'aide d'un microscope binoculaire photonique inversé (Olympus, modèle IMT-2) placé sur une table antivibratoire à l'intérieur d'une cage de Faraday. La chaîne d'acquisition est composée d'une tête d'acquisition (CV203BU Headstage, Axon Instruments, USA) portant un filament chloruré, reliée à un amplificateur (modèle Axopatch 200B, Axon Instruments, USA) possédant un convertisseur courant-tension, lui-même relié à une carte d'acquisition (Digidata 1440A, Axon Instruments, USA) (**Figure 28**).

Les enregistrements sont réalisés à l'aide du logiciel P-Clamp (Clampex, version 10.2, Axon Instruments, USA) permettant de programmer la stimulation de la cellule ainsi que l'acquisition des données. Les valeurs sont ensuite analysées en utilisant le logiciel Clampfit (version 10.2, Axon Instruments, USA).

Les pipettes utilisées sont réalisées par une étireuse verticale (modèle P-30, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) à partir de tubes capillaires en borosilicate (modèle 1-000-1000 de diamètre externe 1,44 mm et de diamètre interne 1,05 mm, Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) de manière à ce qu'une fois remplies de solution intracellulaire, leur résistance soit comprise entre 1 et 2 M Ω .

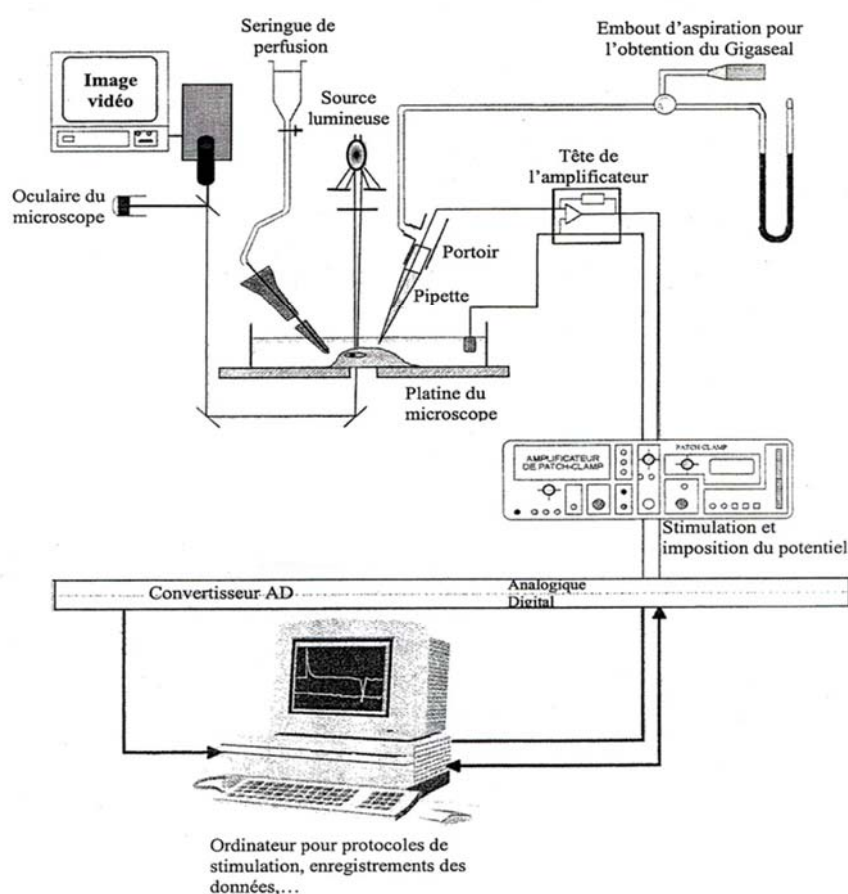


Figure 28 : Schéma du dispositif expérimental et de la chaîne d'acquisition utilisés pour les expériences réalisées par la technique de patch clamp.

(d'après Constantin)

D. Mesures, protocole

Les cellules, conservées en culot cellulaire dans la solution D' (**Table 1**), sont prélevées et déposées 10 minutes avant le début de l'expérience dans des boîtes de pétri à fond en plastique remplies de solution extracellulaire 0 Ca^{2+} (**Table 5**). Lorsque la pipette est posée sur la membrane de la cellule, une succion est appliquée et la cellule est perfusée avec la solution extracellulaire 1,8 mM Ca^{2+} (**Table 5**) afin de faciliter le gigaseal. La portion de membrane située à l'intérieur de la pipette est ensuite rompue par succion et, si besoin, par l'application d'une brève impulsion électrique. Les enregistrements sont réalisés selon le protocole décrit sur la **Figure 29**.

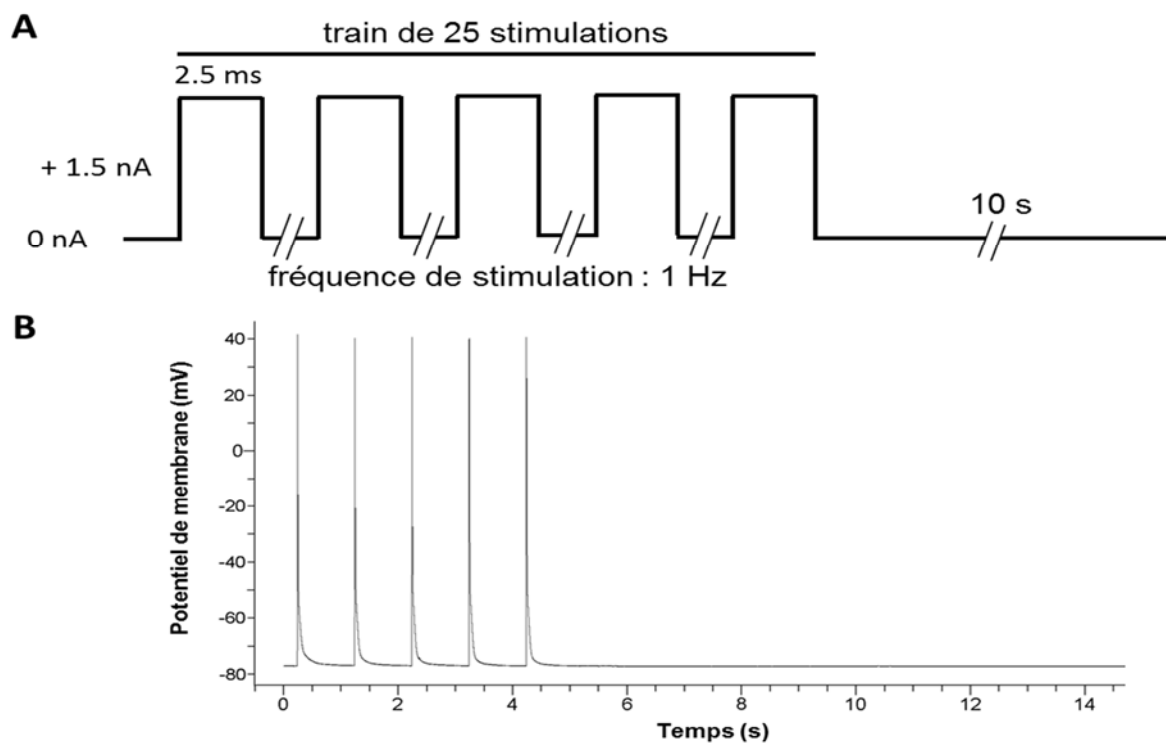


Figure 29 : Protocole expérimental utilisé pour l'enregistrement par la technique de patch clamp de potentiels d'action et du potentiel membranaire de cardiomyocytes ventriculaires de rat.

A : Schéma du protocole expérimental : la cellule est dans un premier temps soumise à un train de vingt-cinq stimulation à la fréquence de 1 Hz puis les impulsions électriques sont stoppées pendant dix secondes, ce protocole est répété en boucle quatre fois de suite à chaque condition expérimentale ; **B :** Exemple de tracé obtenu lors de l'enregistrement du potentiel de membrane d'un cardiomyocyte de rat.

E. Analyse

Les tracés obtenus à partir d'enregistrements réalisés grâce au logiciel Clampex sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Clampfit. Une valeur moyenne du potentiel de repos membranaire est déterminée par le logiciel, puis, un intervalle de ± 2 mV est tracé de part et d'autre de ce potentiel moyen. Les variations de potentiel supérieures à ce seuil de 2 mV sont comptabilisées comme des post-dépolarisations tardives (DADs).

V. Techniques d'imagerie - FRET

A. Principe

Le principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) a été décrit par Förster en 1948. Il s'agit d'un processus par lequel l'énergie est transférée, de façon non radiative, d'un fluorophore dans un état excité (le donneur) à un second fluorophore (l'accepteur). L'énergie absorbée par le premier fluorophore est dissipée par émission de fluorescence de celui-ci, à moins qu'il ne se trouve à proximité d'un fluorophore accepteur. Un transfert d'énergie de fluorescence du donneur vers l'accepteur résultera dès lors, en une diminution du signal de fluorescence du donneur et en une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Les conditions requises pour observer ce phénomène, sont définies par le recouvrement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'excitation de l'accepteur, la distance entre les fluorophores considérés (<100 Å) et une orientation appropriée des dipôles de transition électronique (**Figure 30**). Les méthodes permettant de mesurer l'efficacité de ce transfert sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude des interactions entre macromolécules. Le FRET peut être considéré comme une règle spectroscopique permettant non seulement de colocaliser deux macromolécules avec une résolution supérieure à celle obtenue par imagerie de fluorescence, de mesurer la distance entre deux fluorophores, mais également comme dans notre cas, de mesurer des niveaux de présence de petites molécules ou des activités enzymatiques d'intérêt biologique.

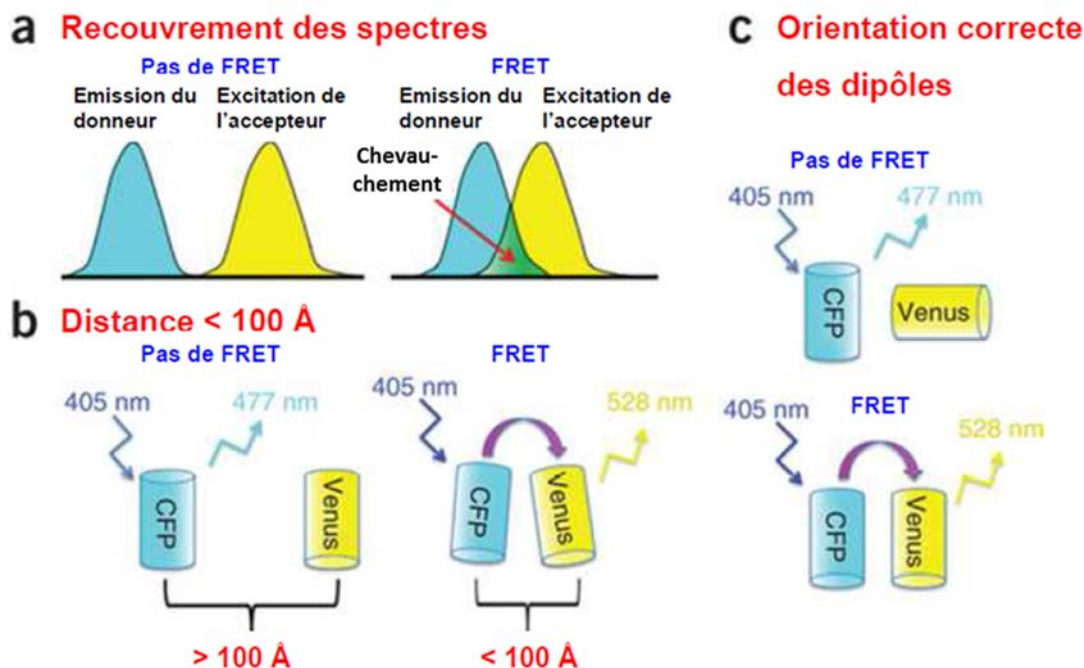


Figure 30 : Schéma du principe et des conditions requises pour le FRET (exemple de FRET entre une CFP et une Vénus).

Le transfert d'énergie a lieu entre deux fluorophores lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption du receveur (a) et lorsque ces fluorophores présentent une distance (<100 Å) (b) et une orientation (c) favorables. CFP : *Cyan Fluorescent Protein*, Venus : *Yellow Fluorescent Protein (YFP)*. (modifié de Broussard et al. 2013)

B. Installation de FRET

Les cellules placées dans le milieu Ringer K^+ (**Table 4**) sont visualisées à l'aide d'un microscope inversé (Nikon TE300) muni d'un objectif à huile de grossissement X40 et connecté à un logiciel (Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) qui commande une caméra CCD refroidie (*Cooled charge coupled*, Device Sensicam PE ; PCO, Kelheim, Allemagne) (**Figure 31**). Les cellules fluorescentes sont sélectionnées et placées à l'embouchure du système de perfusion externe contenant dans chaque capillaire, une des solution d'intérêt. La CFP est excitée pendant 300 msec par une lampe Xenon (100 W, Nikon, Champigny sur Marne, France) en utilisant un filtre de 440/20BP (*band pass*) ainsi qu'un miroir dichroïque 455LP (*long pass*). Un séparateur d'images (*Optosplit II emission splitter* ; Cairn Research, Faversham, UK) équipé d'un miroir dichroïque 495LP et de 2 filtres BP 470/30 (pour la CFP) et 535/30 (pour la YFP) permet de séparer les images CFP et YFP. L'acquisition des images par la caméra se fait toutes les 5 secondes.

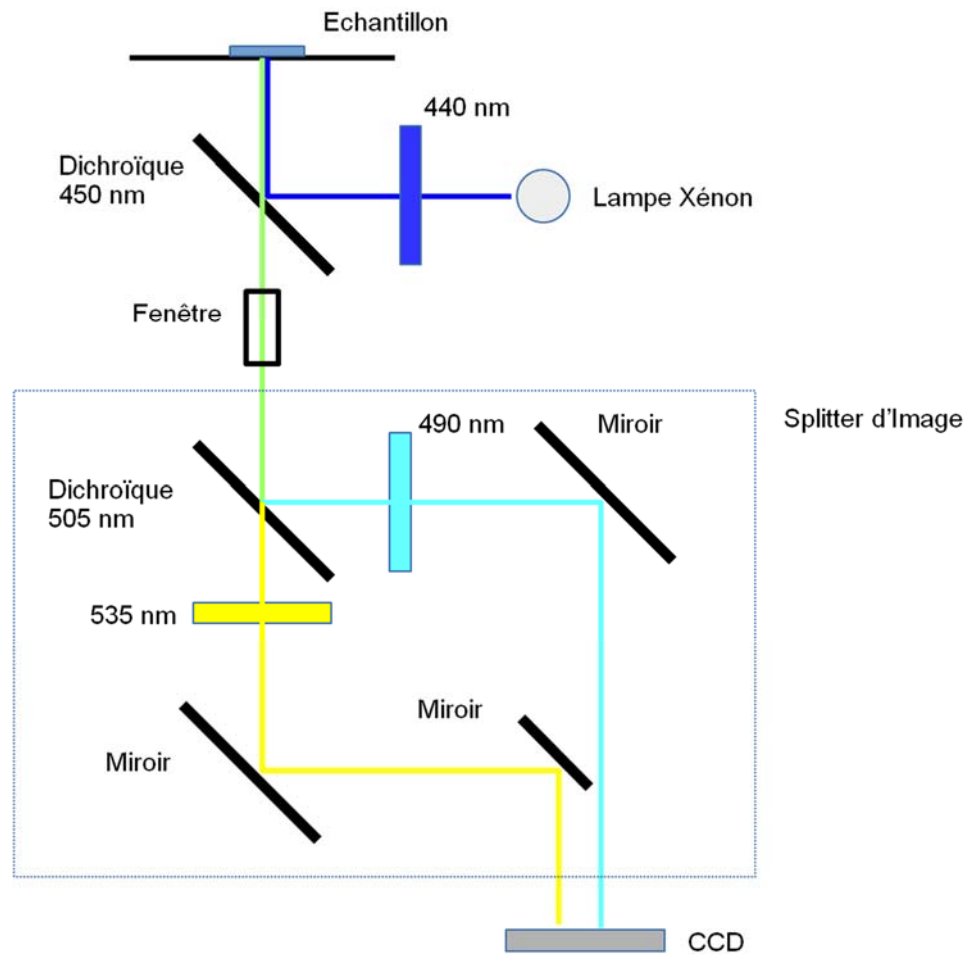


Figure 31 : Montage expérimental permettant la mesure de FRET

L'excitation est filtrée à 440 nm et renvoyée vers l'échantillon par un miroir dichroïque (450 nm). L'émission de fluorescence passe à travers ce miroir et les deux longueurs d'onde sont séparées dans le splitter d'image par un deuxième miroir dichroïque (505 nm). Les deux longueurs d'onde d'émission de la fluorescence sont ensuite filtrées à 490 nm et 535 nm avant d'arriver à la caméra CCD.

C. Sondes FRET

1. Sonde AKAR3-NES

La sonde AKAR3-NES est une protéine recombinante constituée d'un domaine substrat spécifique de la PKA et d'un domaine de fixation du domaine substrat phosphorylé (FHA, *forkhead-associated domain*), intercalés entre des variants de CFP et YFP (**Figure 32**) Allen et Zhang 2006 ; Saucerman et al. 2006). Cette sonde possède également une séquence d'export nucléaire (NES, *Nuclear Export Sequence*) permettant d'éviter son accumulation au niveau du noyau. Lorsque les deux fluorophores sont éloignés, il n'y a pas de transfert d'énergie de l'un à l'autre. Lorsque la PKA est activée, suite à une augmentation d'AMPc

dans la cellule, cette kinase phosphoryle le domaine SP entraînant son repliement et sa fixation au domaine FHA, modifiant ainsi le FRET entre les deux fluorophores. Le spectre d'émission du donneur (CFP) recouvrant partiellement le spectre d'émission de l'accepteur (YFP), il faut soustraire à l'intensité de l'émission de la YFP la part d'émission de fluorescence enregistrée correspondant à l'émission de la CFP (*bleed through*). En tenant compte des fluorophores utilisés et de l'installation (filtres et trajet optique), le *bleed trough* est égal à 60% de l'intensité d'émission de la CFP. L'activité PKA est donc directement proportionnelle au rapport $[YFP - (0,6 * CFP)] / CFP$.

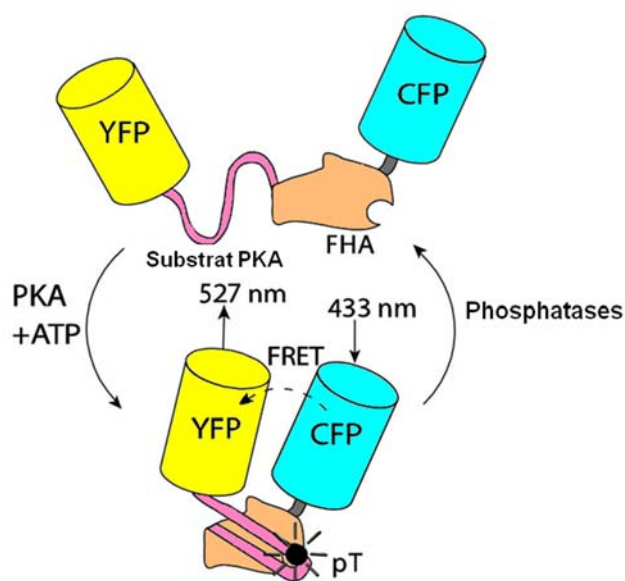


Figure 32 : Fonctionnement de la sonde FRET AKAR3

YFP : *Yellow fluorescent protein*, CFP : *Cyan fluorescent protein*, FHA : *Forkhead-associated domain*, pT : Phosphorylation. (Adapté de Saucerman et al. 2006)

2. Sonde H187

La sonde H187 est une protéine recombinante constituée du domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac intercalé entre deux types de fluorophores : une mTurquoise2 (CFP) et deux Venus (YFP) localisées en tandem (**Figure 33**) Klarenbeek et al. 2011 ; Klarenbeek et al. 2015). Le domaine de liaison à l'AMPc de la protéine Epac présente une mutation Q270E lui conférant une affinité renforcée pour l'AMPc en comparaison des autres sondes de détection de l'AMPc couramment utilisées telles que Epac2-camps. La mTurquoise est pour sa part plus résistante au phénomène de perte d'intensité d'émission en réponse à sa stimulation (*bleaching*) que les autres fluorophores habituellement utilisés telle la CFP

utilisée dans le cas d'Epac2-camps. De plus, la combinaison mTurquoise-VenusVenus permet l'émission d'une fluorescence de plus forte intensité que l'habituel couple CFP-YFP. En absence d'AMPc, la sonde est repliée ce qui permet le FRET entre les fluorophores (**Figure 33**). Lorsque les niveaux d'AMPc augmentent à proximité de la sonde, la fixation du nucléotide cyclique sur la sonde entraîne son dépliement entraînant ainsi une diminution du FRET proportionnelle à l'augmentation de la concentration en AMPc. Comme pour la sonde AKAR, en tenant compte des fluorophores utilisés et de l'installation (filtres et trajet optique), nous avons pu déterminer la valeur de *bleed trough* qui représente 60% de l'intensité d'émission de la CFP. La concentration en AMPc est donc directement proportionnelle au rapport $CFP/[YFP-(0,6*CFP)]$ tenant compte du *bleed through* des deux fluorophores.

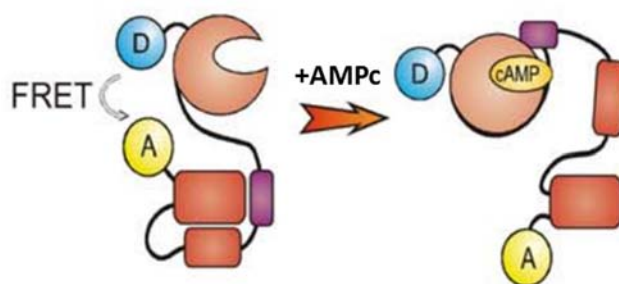


Figure 33 : Schéma de fonctionnement de la sonde FRET H187

D : Donneur (mTurquoise, CFP), A : Accepteur (deux Venus en tandem, YFP).
(Adapté de Klarenbeek et al. 2011)

D. Analyse des données

La moyenne de l'intensité de la fluorescence de la YFP et CFP est mesurée dans une région d'intérêt, comprenant l'ensemble de la cellule définie. Le bruit de fond est soustrait de l'intensité de CFP et YFP. Les rapports YFP/CFP pour AKAR3-NES et mTurquoise/VenusVenus pour la sonde H187 sont exprimés en % d'augmentation par rapport au niveau basal. Les images ratio sont obtenues en utilisant le programme ImageJ 1.44a (NIH, USA).

VI. Méthodes biochimiques

A. Stimulation des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ventriculaires préalablement déposés dans des boîtes de culture sont déprivés en sérum (milieu II) pendant au moins 1h après l'isolement. Les cardiomyocytes sont ensuite pré-stimulés pendant 15 min avec les inhibiteurs de kinases quand la condition expérimentale l'exige, puis stimulés pendant 5 min dans des solutions de stimulation (Ctrl, Iso, Iso + Ro dans une solution de Ringer K⁺). Les étapes de pré-stimulation et de stimulations se font à 37°C.

B. Extraction des protéines totales à partir des cardiomyocytes

Afin d'extraire les protéines totales, les cellules sont lysées à 4°C avec le tampon de lyse RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*) contenant (en mM) : Tris-HCl 50 (pH 7.4), NaCl 150, EDTA 2, NP40 1%, DOC 1%, SDS 0.1% ainsi qu'un cocktail inhibiteur de protéases (Complete Mini EDTA-free, Roche) et un cocktail inhibiteur de phosphatases (PhosSTOP, Roche). Pour les expériences de mesure du degré de phosphorylation de la CaMKII, les cellules sont lysées dans un tampon de lyse RIPA sans EDTA. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés 10 min à 10 000 g à +4°C. Les surnageants contenant l'ensemble des protéines cellulaires sont aliquotés et congelés à -80°C.

C. Dosage des protéines

Le dosage protéique par le BCA (acide bicinchoninique) est une technique dérivée de la méthode au biuret. En conditions alcalines, les ions cuivriques Cu²⁺ se complexent aux liaisons peptidiques des protéines et sont alors réduits en ions cuivreux Cu⁺. Le BCA a la propriété de se lier aux ions cuivreux Cu⁺ pour former un complexe pourpre, en quantité proportionnelle à la concentration en protéines et quantifiable par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 562 nm. Une gamme de solutions de SAB de concentrations connues est réalisée afin d'étalonner le dosage de protéines dans les différents extraits. L'absorbance

mesurée pour chaque échantillon sera ainsi reportée sur la droite étalon afin de déterminer leur concentration protéique.

D. Western Blot

Les niveaux de phosphorylation des protéines clés du couplage excitation-contraction (PLB et RyR2) sont estimés par Western Blot. Cette technique permet de mettre en évidence une protéine spécifique au sein d'un lysat cellulaire. Elle inclut une étape d'électrophorèse permettant de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, une étape de transfert sur membrane indispensable au marquage des protéines par des anticorps spécifiques et enfin une étape de révélation.

1. Electrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide. Les échantillons sont dilués dans un tampon de charge Laemmli (0,1% bleu de bromophénol, 30 mM Tris pH 6,8, 2,5% β -mercaptoéthanol, 1% sodium dodécyl sulfate SDS, 10% glycérol). Les échantillons servant à la révélation du PLB sont incubés pendant 5 minutes à 95°C. Les protéines sont alors dénaturées et chargées négativement par le SDS et le β -mercaptoéthanol. Dans le cas du RyR2, les échantillons sont dilués dans un tampon Laemmli avec β -mercaptoéthanol, sans chauffage. Les échantillons sont déposés sur le gel d'électrophorèse constitué d'un premier gel de concentration à 5% d'acrylamide (5% acrylamide (acrylamide/bisacrylamide 30/0,8), 0,125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,001% Temed), et un second gel de séparation à 6% (RyR2) ou 15% (PLB) d'acrylamide (6%-15% polyacrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfate d'ammonium, 0,001% Temed). Les échantillons sont concentrés dans le premier gel sous l'action d'un champ électrique de 80 V pendant 30 minutes, puis séparés dans le second gel sous l'action d'un champ électrique de 110 V pendant 1h30, dans un tampon de migration (25 mM Tris, 200 mM glycine, 0,1% SDS). Un

marqueur de poids moléculaire est déposé dans un puits séparé et migre en même temps que les échantillons (Page Ruler, Euromedex pour le PLB ; Hi Mark Pre-Stained pour le RyR2).

2. Transfert des protéines sur membrane

En fin d'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, Hybond-P, (Amersham Pharmacia Biotechnologies, Orsay, France)) qui servira de support pour l'immunomarquage. La membrane a été préalablement activée par du méthanol et équilibrée dans un tampon de transfert froid (40 mM Glycine, 25 mM Tris, 20% méthanol). Chargée positivement, elle est mise au contact du gel et retient donc les protéines chargées négativement. Le transfert est effectué pendant 1h30 à +4°C sous l'action d'un champ électrique de 120 V. Pour vérifier la qualité du transfert, la membrane peut être colorée avec du rouge Ponceau S (B6008, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) dissout dans 3% d'acide trichloroacétique.

3. Immunomarquage et révélation

La membrane est saturée 45 minutes avec 5% de lait écrémé en poudre dissout dans un tampon TBS-Tween (50 mM Tris pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20). Cette étape permet de saturer les sites non occupés de la membrane et de prévenir la fixation non spécifique d'anticorps. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à +4°C avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée de la protéine d'intérêt et dilué dans la solution de saturation 5% lait. Le lendemain, après plusieurs lavages des membranes au TBS-Tween, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié, couplé à la peroxydase de raifort HRP (*horseradish peroxidase*). Les protéines d'intérêt sont mises en évidence par chimioluminescence. Les membranes ont été incubées pendant 5 minutes avec le substrat de la peroxydase (Kit Luminata Forte, Millipore). Ce substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux révélé grâce à une caméra (Chemidoc, Biorad).

Les membranes sont ensuite déshybridées avec la solution Re-blot Plus (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) afin d'éliminer les anticorps accrochés. Après une nouvelle étape de saturation, les membranes RyR2 sont incubées avec un nouvel anticorps

primaire dirigé contre la forme totale de RyR2 tandis que les membranes PLB sont incubées avec un nouvel anticorps primaire dirigé contre la β -actine qui est une protéine de référence servant de contrôle de charge (la déshybridation ne fonctionne pas pour les membranes PLB puisque cette solution entraîne une perte de signal). Les étapes suivantes sont les mêmes que celles décrites précédemment : incubation avec l'anticorps secondaire et révélation.

Pour les expériences de Western Blot réalisées pour estimer le degré de phosphorylation de la CaMKII, les échantillons sont déposés sur deux membranes différentes, l'une pour la révélation de la CaMKII phosphorylée sur son site d'autophosphorylation Thr 286 et l'autre pour la forme totale de la CaMKII.

4. Analyse et quantification

L'intensité des différentes bandes est quantifiée à l'aide du logiciel Quantity one. Le rapport des intensités des bandes P-PLB/ β -actine, P-RyR2/RyR2 total et P-CaMKII/CaMKII totale est déterminé et un pourcentage d'augmentation de l'intensité par rapport au contrôle permet de déterminer l'état de phosphorylation de la protéine d'intérêt dans les différentes conditions testées. Au minimum cinq Western Blots différents sont réalisés pour chaque condition et une moyenne \pm SEM est déterminée.

5. Anticorps

Les anticorps primaires dirigés contre les substrats de la PKA et de la CaMKII que nous avons étudiés sont listés ci-dessous :

- Anti-phospho-phospholamban (P-PLB) Ser 16 : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la sérine 16 phosphorylée de PLB (site spécifique de la PKA), dilué au 1/5 000 dans la solution de saturation (Badrilla, Leeds, R-U).
- Anti-phospho-phospholamban (P-PLB) Thr 17 : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la thréonine 17 phosphorylée de PLB (site spécifique de la CaMKII), dilué au 1/10 000 dans la solution de saturation (Badrilla, Leeds, R-U).

- Anti-phospholamban total (PLB total) : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la forme totale du PLB, dilué au 1/10 000 dans la solution de saturation (Cell Signalling, Beverly, MA, USA).
- Anti-phospho-ryanodine receptor 2 (P-RyR2) Ser 2808 : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la sérine 2808 phosphorylée de RyR2 (site spécifique de la PKA), dilué au 1/5 000 dans la solution de saturation (Badrilla, Leeds, R-U).
- Anti-phospho-ryanodine receptor 2 (P-RyR2) Ser 2814 : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la sérine 2814 phosphorylée de RyR2 (site spécifique de la CaMKII), dilué au 1/5 000 dans la solution de saturation (Badrilla, Leeds, R-U).
- Anti-ryanodine receptor 2 total (RyR2 total) : anticorps polyclonal produit chez la souris, dirigé contre la forme totale du RyR2, dilué au 1/2 000 dans la solution de saturation (Thermo Fischer, Villebon s/ Yvette, FRA).
- Anti-phospho-CaMKII (P-CaMKII) : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la thréonine 286 phosphorylée de la CaMKII, dilué au 1/1 000 dans la solution de saturation (Cell Signalling, Beverly, MA, USA).
- Anti-CaMKII totale (CaMKII totale) : anticorps polyclonal produit chez le lapin, dirigé contre la forme totale de la CaMKII, dilué au 1/1 000 dans la solution de saturation (Cell Signalling, Beverly, MA, USA).
- Anti- β -actine (β -actine) : anticorps polyclonal produit chez la souris, dirigé contre la β -actine, dilué au 1/20 000 dans la solution de saturation (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase HRP utilisés pour la révélation sont les suivants :

- Anti-lapin couplé à la peroxydase, anticorps produit chez la chèvre, dilué au 1/10 000 dans du tampon TBS-Tween (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- Anti-souris couplé à la peroxydase, anticorps produit chez la chèvre, dilué au 1/10 000 dans du tampon TBS-Tween (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
-

VII. Solutions

Pour les expériences de IonOptix et de FRET, les cellules (ARVM et APVM) baignent dans le milieu Ringer K^+ dont la composition est définie en **Table 4**. Le milieu Ringer K^+ est également utilisé pour la stimulation des cellules pour les expériences de Western Blot. Pour les expériences de mesure de la fuite et de la charge en Ca^{2+} du RS, des solutions $0Na^+/0Ca^{2+} \pm$ tétracaïne (1 mM) et $0Na^+/0Ca^{2+} +$ caféine (10 mM) définies **Table 4** sont également utilisées. Pour les expériences de patch clamp, les cellules sont conservées en culot cellulaire dans la solution D' définie **Table 1** et placées dans une boîte à fond de plastique dans la solution extracellulaire définie **Table 5** et ce 10 minutes avant le début de l'expérience. La pipette est remplie d'une solution intracellulaire dont la composition est décrite **Table 5**.

Pour les expériences réalisées sur les ARVM, l'Isoprénaline (Iso) est appliquée de façon maintenue à la concentration de 1 nM, alors que pour les expériences réalisées sur les APVM, l'Iso est appliquée à la concentration de 10 nM. Les différents inhibiteurs utilisés pour les expériences de physiologie et/ou de biochimie sont présentées dans la **Table 6**. Les inhibiteurs de kinases (le KN-93 et son analogue inactif le KN-92, et le H-89 tous utilisés à 10 μM) et d'Epac (CE3F4 et Esi-05 utilisés respectivement à 10 μM et 5 μM) sont d'abord appliqués en pré-incubation pendant 15 minutes avant d'être maintenus au cours des expériences. Le PKI est utilisé sous forme d'adénovirus (voir chapitre correspondant). L'AIP est utilisé à 100 nM uniquement en pré-incubation de 15 minutes pendant le temps de désestérification de la sonde Ca^{2+} (Fura-2 AM) puis est rincé avant le début de l'expérience. Les inhibiteurs de PDE3 (cilostamide, Cil) et de PDE4 (Ro 20-1724, Ro) sont utilisés respectivement à 1 μM et 10 μM .

Agents pharmacologiques	Propriété	Concentration(s) utilisée(s)	Fournisseur
Isoprénaline (Iso)	Agoniste β -AR	1 nM (rat) / 10 nM (cochon)	Sigma Aldrich
Ro 20-1724 (Ro)	Inhibiteur sélectif de PDE4	10 μ M	Calbiochem
Cilostamide (Cil)	Inhibiteur sélectif de PDE3	1 μ M	Tocris Bioscience
IBMX	Inhibiteur non-spécifique de PDE	100 μ M	Sigma Aldrich
KN-93	Inhibiteur de CaMKII	10 μ M	Calbiochem
KN-92	Analogue inactif du KN-93	10 μ M	Calbiochem
H-89	Inhibiteur de PKA	10 μ M	Tocris Bioscience
AIP	Inhibiteur de CaMKII	100 nM	Calbiochem
CE3F4	Inhibiteur de Epac1	10 μ M	P. Bouyssou (Institut de Chimie Organique et Analytique, Orléans)
Esi-05	Inhibiteur de Epac2	5 μ M	BioLog
Tétracaïne	Antagoniste des RyR2	1 mM	Santa Cruz Biotechnology
Caféine	Agoniste des RyR2	10 mM	Merck

Table 6 : Agents pharmacologiques utilisés dans les expériences associés à leur propriété et leur(s) concentration(s) d'utilisation

IBMX : 3-Isobutyl-1-methylxanthine, AIP : Autocamtide-2 Related Inhibitor Peptide.

VIII. Analyses statistiques

Tous les résultats présentés sont issus d'expériences réalisées sur au minimum trois animaux différents afin de s'affranchir d'une variabilité inter-animal. Les analyses statistiques sont effectuées grâce au logiciel GraphPad Prism (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). Dans le cas de comparaisons multiples entre groupes (nombre de groupes ≥ 3) pour l'analyse statistique des transitoires Ca^{2+} (amplitude et τ), de la contraction (amplitude et τ), de la fuite et de la charge en Ca^{2+} du RS, un test d'analyse de variance à une voie (ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Tukey ont été utilisés. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn ont été utilisés pour l'analyse des différences de fréquence de survenue de VCS et de DADs et pour les résultats des expériences de FRET. Un test de Friedman suivi d'une comparaison multiple de Dunn ont été utilisés pour l'analyse des différences entre

conditions dans les expériences de Western Blot. Pour déterminer des différences statistiquement significatives entre deux groupes, le test t de Student a été utilisé pour l'analyse des différences de fuite et de charge en Ca^{2+} du RS, et un test de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse des différences d'amplitude des transitoires Ca^{2+} et de fréquence de survenue de VCS.

Les différences sont considérées significatives lorsque le résultat du test statistique employé fournit un $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) et $p \leq 0,001$ (***), et non significatives si $p > 0,05$.

RESULTATS

RESULTATS

I. Régulation du couplage excitation-contraction cardiaque par les phosphodiesterases des nucléotides cycliques

A. Introduction

Les niveaux d'AMPc résultent de la balance entre l'activité des adénylate cyclases responsables de sa synthèse, et l'activité de dégradation de ce second messenger par les PDE dont les familles PDE1, PDE2, PDE3 et PDE4 représentent l'activité majeure au niveau cardiaque. Malgré la disponibilité d'inhibiteurs sélectifs de PDE2, PDE3 ou PDE4, la contribution respective de ces familles dans la régulation du CEC cardiaque n'était pas complètement établie, notamment du fait de l'absence d'une étude comparative réalisée sur une même préparation cardiaque.

L'objectif de cette étude a été de déterminer le rôle des familles de PDE2, PDE3 et PDE4 dans la régulation du CEC, en conditions basales ou en réponse à une stimulation β -AR, sur des cardiomyocytes ventriculaires isolés de rats adultes. Nous avons pour cela réalisé une étude des effets d'inhibiteurs des PDE2, 3 et 4 sur les transitoires Ca^{2+} et la contraction cellulaire en parallèle d'une étude des degrés de phosphorylation par la PKA des protéines clés du CEC (LTCC, RyR2, TnI, MyBPc et PLB) évalués par Western Blot. Ma participation à ce travail a porté sur l'étude des rôles de la PDE3 et de la PDE4 dans le contrôle de la charge en Ca^{2+} du RS et la régulation du pourcentage des réserves Ca^{2+} du RS libéré à chaque transitoire Ca^{2+} (*fractional release*), ainsi que sur l'étude de l'implication de la CaMKII dans les effets des inhibiteurs des PDE observés sur le CEC.

B. Résultats

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article qui suit :

Article 1 :

Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes

Mika D, Bobin P, Pomérance M, Lechène P, Westenbroek R, Catterall W, Vandecasteele G, Leroy J, Fischmeister R.

Differential regulation of cardiac excitation–contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes

Delphine Mika^{1,2}, Pierre Bobin^{1,2}, Martine Pomérance^{1,2}, Patrick Lechêne^{1,2}, Ruth E. Westenbroek³, William A. Catterall³, Grégoire Vandecasteele^{1,2*}, Jérôme Leroy^{1,2}, and Rodolphe Fischmeister^{1,2*}

¹INSERM UMR-S 769, Châtenay-Malabry, France; ²Faculty of Pharmacy, University Paris-Sud, LabEx LERMIT, DHU TORINO, IFR141, Châtenay-Malabry, France; and ³Department of Pharmacology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA 98195-7280, USA

Received 13 December 2012; revised 31 July 2013; accepted 6 August 2013; online publish-ahead-of-print 9 August 2013

Time for primary review: 41 days

Aims	Multiple phosphodiesterases (PDEs) hydrolyze cAMP in cardiomyocytes, but the functional significance of this diversity is not well understood. Our goal here was to characterize the involvement of three different PDEs (PDE2–4) in cardiac excitation–contraction coupling (ECC).
Methods and results	Sarcomere shortening and Ca^{2+} transients were recorded simultaneously in adult rat ventricular myocytes and ECC protein phosphorylation by PKA was determined by western blot analysis. Under basal conditions, selective inhibition of PDE2 or PDE3 induced a small but significant increase in Ca^{2+} transients, sarcomere shortening, and troponin I phosphorylation, whereas PDE4 inhibition had no effect. PDE3 inhibition, but not PDE2 or PDE4, increased phospholamban phosphorylation. Inhibition of either PDE2, 3, or 4 increased phosphorylation of the myosin-binding protein C, but neither had an effect on L-type Ca^{2+} channel or ryanodine receptor phosphorylation. Dual inhibition of PDE2 and PDE3 or PDE2 and PDE4 further increased ECC compared with individual PDE inhibition, but the most potent combination was obtained when inhibiting simultaneously PDE3 and PDE4. This combination also induced a synergistic induction of ECC protein phosphorylation. Submaximal β -adrenergic receptor stimulation increased ECC, and this effect was potentiated by individual PDE inhibition with the rank order of potency $\text{PDE4} = \text{PDE3} > \text{PDE2}$. Identical results were obtained on ECC protein phosphorylation.
Conclusion	Our results demonstrate that PDE2, PDE3, and PDE4 differentially regulate ECC in adult cardiomyocytes. PDE2 and PDE3 play a more prominent role than PDE4 in regulating basal cardiac contraction and Ca^{2+} transients. However, PDE4 becomes determinant when cAMP levels are elevated, for instance, upon β -adrenergic stimulation or PDE3 inhibition.
Keywords	Phosphodiesterase • Excitation–contraction coupling • cAMP • Protein phosphorylation

1. Introduction

The cAMP pathway is critical for autonomic regulation of the heart. Sympathetic stimulation increases myocardial contractility mainly through stimulation of β -adrenergic receptors (β -ARs), elevation of intracellular cAMP ($[\text{cAMP}]_i$), and activation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA). PKA, in turn, phosphorylates key components of cardiac excitation–contraction coupling (ECC), such as the L-type Ca^{2+} channel ($\text{Ca}_v1.2$), ryanodine receptor type 2 (RyR2), phospholamban

(PLB), troponin I (TnI), and myosin-binding protein C (MyBP-C). The phosphorylation of $\text{Ca}_v1.2$ and RyR2 leads to enhanced Ca^{2+} influx and sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} release, contributing to enhanced Ca^{2+} transients. PLB phosphorylation increases SR Ca^{2+} uptake by the Ca^{2+} ATPase (SERCA2), thus accelerating cardiac relaxation but also increasing SR Ca^{2+} load and consequently SR Ca^{2+} release. The phosphorylation of TnI and MyBP-C reduces myofilament Ca^{2+} affinity and increases cross-bridge kinetics. Altogether, these events produce the typical inotropic and lusitropic effects of β -AR stimulation.¹

* Corresponding authors: Tel: +33 1 46 83 57 71; fax: +33 1 46 83 54 75. Email: gregoire.vandecasteele@u-psud.fr (G. Vandecasteele); rodolphe.fischmeister@inserm.fr (R. Fischmeister).
Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2013. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

Intracellular cAMP levels result from the balance between cAMP synthesis by adenylyl cyclases and cAMP degradation by cyclic-nucleotide phosphodiesterases (PDEs). PDEs are subdivided into 11 families among which four can hydrolyse cAMP in the heart: PDE1, which is activated by Ca^{2+} /calmodulin; PDE2, which is stimulated by cGMP; PDE3, which is inhibited by cGMP; and PDE4.² While PDE1 and PDE2 can hydrolyse both cAMP and cGMP, PDE3 preferentially hydrolyses cAMP and PDE4 is specific for cAMP. Another PDE, named PDE8A, which specifically hydrolyses cAMP, was shown recently to control ECC in mouse cardiac myocytes.³ All PDE isoforms except PDE8A^{4,5} are inhibited by xanthine derivatives such as 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), and a number of drugs have been developed as selective PDE inhibitors^{6,7}: erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine⁸ and Bay 60-7550⁹ for PDE2; milrinone, cilostamide (Cil), and other bipyridines for PDE3⁷; rolipram and Ro 20-1724 for PDE4.⁷ There is currently no commercially available selective inhibitor of PDE1.

Direct monitoring of cAMP in living cardiac myocytes emphasized the importance of PDE isoforms 2–4 for the control of $[\text{cAMP}]_i$. In the rodent heart, a predominance of PDE4 over other PDEs for the control of cAMP signals generated by stimulation of β -ARs and other G_s PCRs was observed.^{10–14} PDE4 was shown to associate with β -ARs and ECC proteins, either directly or through scaffold proteins such as β -arrestins or A-kinase anchoring proteins.^{15,16} In the mouse heart, a specific PDE4 variant (PDE4D3) was shown to control the phosphorylation of RyR2 and regulates a diastolic SR Ca^{2+} leak.¹⁷ Similarly, a PDE4D variant was found to co-immunoprecipitate with SERCA2 in mouse and to control PLB phosphorylation and Ca^{2+} transient decay kinetics.¹⁸

As $\text{Ca}_v1.2$ is a well-characterized target of the cAMP/PKA pathway in the heart, the cardiac L-type Ca^{2+} channel current ($I_{\text{Ca,L}}$) has been frequently used as a functional index of the contribution of PDE isoforms to this pathway. Inhibition of PDE2, PDE3, and PDE4 was shown to increase $I_{\text{Ca,L}}$ amplitude in a number of species.^{12,19–24} Recently, we observed in the mouse heart that a PDE4B variant associates with $\text{Ca}_v1.2$ and controls its activity upon β -AR stimulation.²⁵ However, important differences exist among species as to whether PDE3 or PDE4 is predominant, and whether all three PDE isoforms control the $I_{\text{Ca,L}}$ amplitude at basal or only upon β -AR stimulation. PDE3 inhibitors were also reported to increase SR Ca^{2+} uptake and SR Ca^{2+} content,^{26–28} an effect attributed to an increase in PKA-dependent phosphorylation of PLB.

While it is well established that PDE3 inhibition exerts a direct positive inotropic effect in the heart from large mammals,^{29–31} the contribution of other PDE families to the regulation of cardiac contractility remains less clear and often controversial.³² For instance, while selective inhibition of PDE2 or PDE4 was shown to increase cardiac contractility following β -AR stimulation in some studies,^{33–37} other studies failed to demonstrate an effect.^{38,39}

In an attempt to reconcile these contradictory findings, we compared, in the same mammalian cardiac preparation (adult rat ventricular myocytes, ARVMs), the effect of a selective inhibition of PDE2, PDE3, and PDE4 on Ca^{2+} transients, sarcomere shortening, and phosphorylation of five key ECC proteins (TnI, $\text{Ca}_v1.2$, RyR2, PLB, and MyBP-C). Furthermore, we compared for each PDE isoform, the effects observed under basal condition and after sub-maximal β -AR stimulation with isoprenaline (Iso). Our study sheds new light on the respective contribution of the three major cardiac PDE isoforms in the regulation of cardiac ECC.

2. Methods

All experiments were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (86/609/CEE, CE Off J

n°L358, 18 December 1986), the local Ethics Committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines, and the French decree n°87–848 of 19 October 1987 (J Off Rép Fr, 20 October 1987, pp. 12 245–12 248). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the Ministère Français de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (n° 92–283, 27 June, 141 2007).

2.1 Reagents

Bay 60-7550 (Bay, 2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-7-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-phenylbutyl]-5-methyl-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-one) was from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland): it blocks PDE2 with an IC_{50} value of 4.7 nM⁴⁰ and was used here at a 100-nM concentration to fully block the enzyme.⁹ Cil was from Tocris Bioscience (Bristol, UK): it blocks PDE3 with an IC_{50} ranging from 5⁴¹ to 27 nM⁴² and was used here at a 1- μM concentration. Ro 20-1724 [Ro, 4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidone] was from Calbiochem (Darmstadt, Germany): it blocks PDE4 with an IC_{50} value around 1 μM ^{43,44} and was used here at 10 μM . At these concentrations, Bay, Cil, and Ro were shown to be selective for PDE2, PDE3, and PDE4, respectively (Supplementary material online, Table S1). IBMX and Iso were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France).

2.2 Cardiomyocyte isolation and culture

Male Wistar rats (250–300 g) were subjected to anaesthesia by intraperitoneal injection of pentothal (0.1 mg/g) and hearts were excised rapidly. Individual ARVMs were obtained by retrograde perfusion of the heart as previously described.²³ For enzymatic dissociation, the hearts were perfused retrogradely at a constant flow of 6 mL/min at 37°C with a Ca^{2+} -free Ringer solution containing (in mM): NaCl 117, KCl 5, NaHCO_3 4.4, KH_2PO_4 1.5, MgCl_2 1.7, D-glucose 11.7, Na-phosphocreatine 10, taurine 20, and 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) 21, pH 7.1 during 5 min, followed by a perfusion at 4 mL/min for 1 h with the same solution containing 1 mg/mL of collagenase A (Boehringer, Mannheim, Germany) and 300 μM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and CaCl_2 to adjust free Ca^{2+} concentration to 20 μM . The ventricles were then separated from atria, finely chopped, and gently agitated to dissociate individual cells. The resulting cell suspension was filtered on a gauze, and the cells were allowed to settle down. The supernatant was discarded and cells resuspended four more times with Ringer solution at increasing $[\text{Ca}^{2+}]$ from 20 to 300 μM . Freshly isolated cells were suspended in minimal essential medium (MEM: M 4780; Sigma, St Louis, MO USA) containing 1.2 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ supplemented with 2.5% foetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1% penicillin–streptomycin, 20 mM HEPES (pH 7.6), and plated on 35 mm, laminin-coated culture dishes (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at a density of 10^4 cells per dish. After 1 h, the medium was replaced by 300 μL of FBS-free MEM. All experiments were performed on primary cell cultures 24 h after plating.

2.3 Measurements of Ca^{2+} transients and sarcomere shortening

Isolated cardiomyocytes were loaded with 5 μM Fura-2 AM (Invitrogen) at room temperature for 15 min and then washed with Ringer solution containing (in mM): NaCl 121.6, KCl 5.4, NaHCO_3 4.013, NaH_2PO_4 0.8, HEPES 10, glucose 5, Na pyruvate 5, MgCl_2 1.8, CaCl_2 1.8, pH 7.4. The loaded cells were field stimulated (5 V, 4 ms) at a frequency of 0.5 Hz. Sarcomere length (SL) and Fura-2 ratio (measured at 512 nm upon excitation at 340 and 380 nm) were simultaneously recorded using an IonOptix System (IonOptix, Milton, MA, USA). Briefly, myocytes were imaged at 240 Hz using an IonOptix Myocam-S CCD camera. Images were displayed within the IonWizard acquisition software (IonOptix). The myocyte of interest was aligned horizontally, parallel to the field of view. The SL was measured from a user-defined region of interest that included at least seven sarcomeres to maximize the accuracy of the measurements. The IonWizard software determined a density trace corresponding to the alternating dark and light

A- and I-bands of the cardiomyocyte, and analysed the periodicity in the density trace by calculation of a fast Fourier transform. This analysis allowed a direct real-time measurement of SL.

The measurements of Ca^{2+} transients and sarcomere shortening were performed on individual myocytes superfused for few minutes with control Ringer solution and then challenged with PDE inhibitors (single: Bay, 100 nM; Cil, 1 μM ; Ro, 10 μM , or IBMX, 100 μM ; or combinations: Bay + Ro, Bay + Cil or Cil + Ro) during 15 min or with 1 nM Iso during 10 min followed by 10 min treatment with PDE inhibitors (Bay, Cil, or Ro). SR Ca^{2+} load was measured by rapid application of caffeine (10 mM) to ARVMs after pacing at 0.5 Hz in control Ringer solution or after Cil or Cil + Ro application. Fractional Ca^{2+} release was calculated as the ratio between the Ca^{2+} transient amplitude and the caffeine transient amplitude (SR Ca^{2+} load) measured in the same ARVM.

2.4 Cell extracts and western blot analysis

Prior to cell homogenization and biochemical analysis, intact ARVMs were treated at room temperature for 15 min with PDE inhibitors (single: Bay, 100 nM; Cil, 1 μM ; Ro, 10 μM , or IBMX, 100 μM ; or combinations: Bay + Ro, Bay + Cil or Cil + Ro), or for 10 min with 1 nM Iso followed by 10 min treatment with PDE inhibitors (Bay, Cil, or Ro). To prepare whole ARVM cell lysates, cells were lysed in cold HEPES, NaCl, Triton, glycerol lysis buffer containing (in mM): HEPES 50 (pH 7.5), NaCl 400, NaF 100, Na-pyrophosphate 10, MgCl_2 1.5, EGTA 1, 10% glycerol, 1% Triton X-100 supplemented with 1 mM Na_3VO_4 , and a protease inhibitor mixture [1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride hydrochloride, 1 mM benzamide, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of soybean trypsin inhibitor, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of antipain, and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pepstatin]. The lysates were centrifuged at 10 000 g for 10 min and assayed for protein concentration using the bicinchoninic acid-protein reagent (Sigma-Aldrich). For immunoblotting assays, proteins were resolved by 4–12% or 8–16% SDS-PAGE (Lonza Verviers, Verviers, Belgium), transferred onto nitrocellulose membranes, and stained with 3% Ponceau S (Sigma-Aldrich). The membranes were saturated with 3% bovine serum albumin. Phosphorylation of PLB at Ser¹⁶ and cardiac TnI at Ser^{23/24} were detected using specific antibodies from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Phosphorylation of RyR2 at Ser²⁸⁰⁹ was detected using a specific antibody kindly provided by Dr A.R. Marks (Columbia University, USA). L-type Ca^{2+} channel pore-forming subunit ($\text{Ca}_v1.2$) phosphorylation at Ser¹⁹²⁸ was detected using the anti-CH3-P antibody.⁴⁵ Phosphorylation of MyBP-C at Ser²⁸² was detected using antibodies from Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA). Immunoreactive proteins were revealed using a 1 : 30 000 dilution of anti-rabbit or anti-mouse IgG peroxidase conjugate antibodies (Promega Corp., Madison, USA) and were visualized with the Supersignal West Pico reagent (Perbio Science, Vigneux, France). The membranes were stripped and reprobed with specific antibodies against calsequestrin (CSQ) (Affinity BioReagents, Ozyme, Saint-Quentin-Fallavier, France) used as a loading control. Each sample was normalized to CSQ (phosphorylated proteins/CSQ ratio) and double-normalized to the control ratio. Densitometric analyses of western blots were performed using the NIH ImageJ software.

2.5 Data Analysis

Cell contraction was assessed by the percentage of sarcomere shortening, which is the ratio of twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic SLs) to end-diastolic SL. Ca^{2+} transient amplitude was assessed by the percentage of variation in the Fura-2 ratio, by dividing the twitch amplitude (difference of end-diastolic and peak systolic ratios) to the end-diastolic ratio. Relaxation was assessed by measuring the time-to-50% relaxation from the time-to-peak shortening, and the Ca^{2+} transient decay was evaluated by measuring the time-to-50% decay of the Fura-2 ratio from the time-to-peak ratio. These parameters were obtained by analysing the 10 last contractions and calcium transients before addition of the next drug. All parameters were calculated offline on a dedicated software (IonWizard 6x, IonOptix). All results are expressed as mean \pm SEM. The GraphPad

Prism software (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis. To determine statistical significance with multiple groups, we used a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman–Keuls test for multiple comparisons. Differences with P -values of <0.05 were considered as statistically significant. The number of independent experiments performed is indicated in the figure legends.

3. Results

3.1 Regulation of ECC by PDE2, PDE3, and PDE4 in ARVMs

To investigate the functional consequences of individual PDE inhibition on basal and β -AR-stimulated ECC in ARVMs, Ca^{2+} transients and sarcomere shortening were simultaneously recorded in Fura-2-loaded ARVMs. In quiescent myocytes, the average diastolic SL was $1.68 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ($n = 95$) (Supplementary material online, Table S2). Upon pacing at 0.5 Hz, the average peak amplitude of Ca^{2+} transients was $22 \pm 0.1\%$ above the diastolic Fura-2 ratio (Supplementary material online, Table S3), whereas SL decreased by $0.78 \pm 0.05\%$ ($n = 95$) (Supplementary material online, Table S1). The relaxation kinetics of both parameters, as estimated by the time-to-50% decay ($t_{1/2 \text{ off}}$), were on average $0.43 \pm 0.01 \text{ s}$ for Ca^{2+} transients and $0.49 \pm 0.02 \text{ s}$ for cell contraction ($n = 95$). On average, application of 1 nM Iso increased the amplitude of Ca^{2+} transients by $257 \pm 20.3\%$ and sarcomere shortening by $1033.8 \pm 61.2\%$, ($n = 62$, $P < 0.001$ vs. control). Iso also significantly accelerated the relaxation phases of both signals, decreasing $t_{1/2 \text{ off}}$ for Ca^{2+} decay by $38.4 \pm 1.6\%$, and $t_{1/2 \text{ off}}$ for contraction by $56.3 \pm 1.3\%$ ($n = 62$, $P < 0.001$ vs. control). As shown in Supplementary material online, Figure S1, the Iso response on Ca^{2+} transients and cell shortening was stable during the 10-min incubation period, suggesting that β -AR stimulation by 1 nM Iso does not induce desensitization of the receptors, in our experimental conditions.

In a first series of experiments, the effects of PDE2 inhibition were tested (Figure 1 and Supplementary material online, Tables S2 and S3) using the selective inhibitor Bay. As shown on the representative traces in Figure 1A and on the summary data in Figure 1B, 100 nM Bay increased basal Ca^{2+} transient amplitude and basal cell contraction \sim two-fold. Bay also accelerated the decay kinetics of both signals, as shown by a significant decrease in the $t_{1/2 \text{ off}}$ values for both parameters (Figure 1C). These effects were small when compared with that of 1 nM Iso. To examine whether PDE2 modulates ECC under β -AR stimulation, 100 nM Bay was applied on the top of Iso. As shown in Figure 1A and Supplementary material online, Tables S2 and S3, the Iso effect was potentiated upon PDE2 inhibition. However, the decay kinetics of the signals were unchanged compared with those obtained under Iso stimulation (Figure 1C).

We next studied the consequences of a selective PDE3 inhibition on Ca^{2+} transients and cell contraction using Cil (Figure 2 and Supplementary material online, Tables S2 and S3). Application of 1 μM Cil alone induced a significant increase in Ca^{2+} transient and sarcomere shortening amplitudes by \sim two- and three-folds, respectively (Figure 2A and B). Cil also significantly accelerated the decay kinetics of both signals (Figure 2C). This was accompanied by an increase in SR Ca^{2+} load with no change in SR fractional Ca^{2+} release (Figure 5). PDE3 inhibition also strongly potentiated the effect of Iso on both parameters, enhancing their amplitude by $\sim 30\%$ for Ca^{2+} transient and 70% for cell shortening (Figure 2B), and accelerating their relaxation kinetics (Figure 2C).

In contrast to the results obtained with PDE2 or PDE3 inhibitors, PDE4 inhibition by 10 μM Ro had no effect on Ca^{2+} transients and

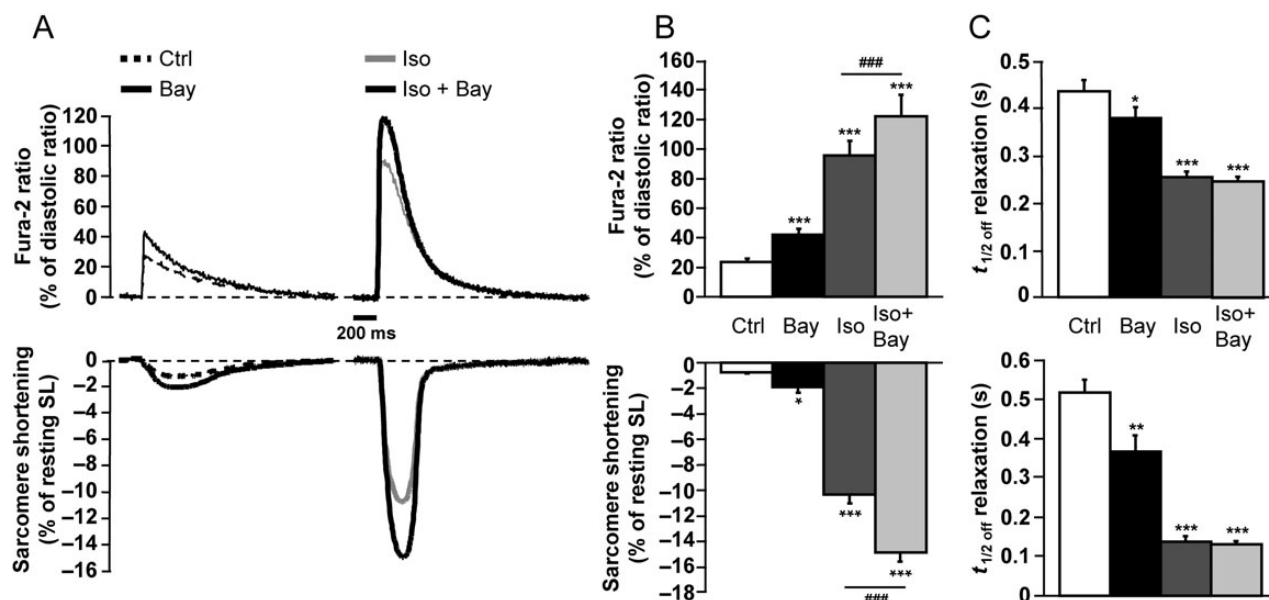


Figure 1 Effect of PDE2 inhibition on ECC in ARVMs. (A) Representative traces of Ca^{2+} transients (top) and sarcomere shortening (bottom) recorded in ARVMs paced at 0.5 Hz and loaded with Fura-2 AM (5 μM) showing the effect of PDE2 inhibition by Bay (0.1 μM) (in black) on basal conditions (dashed lines) or upon β -adrenergic stimulation by 1 nM Iso (in grey). (B) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca^{2+} transients (upper graph, in % of diastolic ratio) and sarcomere shortening (lower graph, in % of resting SL) in control (white bar, $n = 24$ cells, 13 rats), Bay (black bar, $n = 24$ cells, 13 rats), Iso (dark grey bar, $n = 11$ cells, 4 rats), and Iso + Bay (light grey bar, $n = 11$ cells, 4 rats). (C) Average time-to-50% relaxation of Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in similar experimental conditions as in (B). Statistical significance is indicated as: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; and ### $P < 0.001$ (one-way ANOVA, Newman–Keuls).

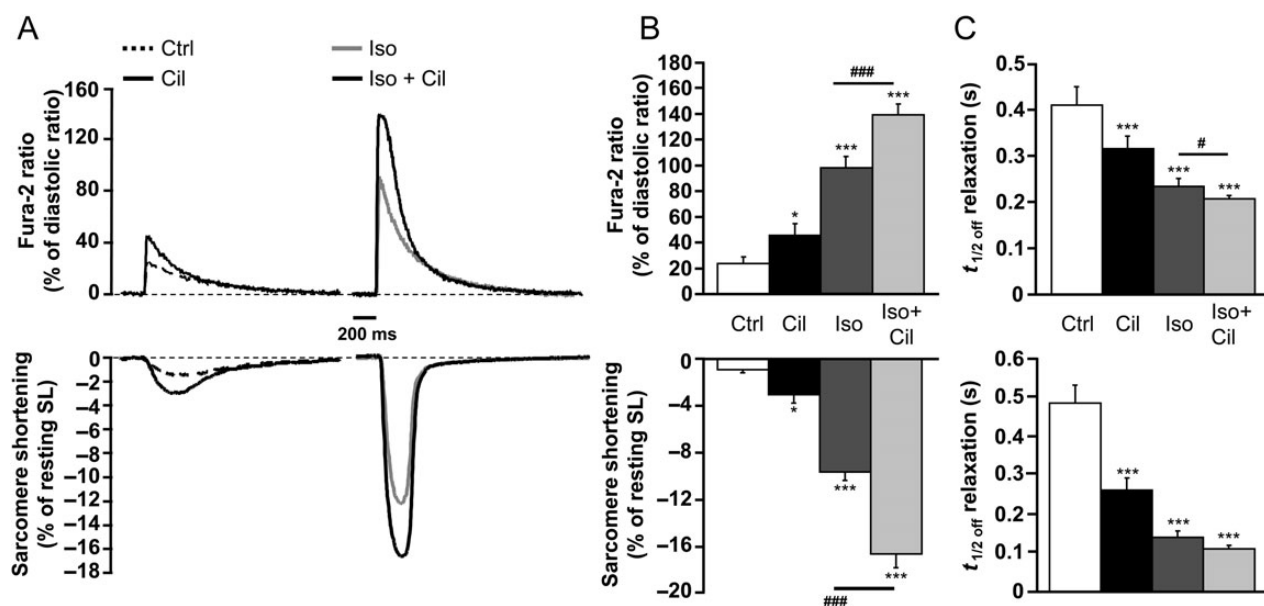


Figure 2 Effect of PDE3 inhibition on ECC in ARVMs. (A) Typical traces of Ca^{2+} transients (top) and sarcomere shortening (bottom) in Fura-2 loaded ARVMs electrically stimulated (0.5 Hz) representing the effect of PDE3 inhibition by Cil (1 μM) (in black) under basal conditions (dashed lines) or during Iso stimulation (1 nM) (in grey). (B) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in control conditions (white bar, $n = 16$ cells, 7 rats), Cil (black bar, $n = 16$ cells, 7 rats), Iso (dark grey bar, $n = 9$ cells, 3 rats), and Iso + Cil (light grey bar, $n = 9$ cells, 3 rats). (C) Average time-to-50% relaxation for Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) are presented for each condition tested. Statistical significance is indicated as: * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; and # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ (one-way ANOVA, Newman–Keuls).

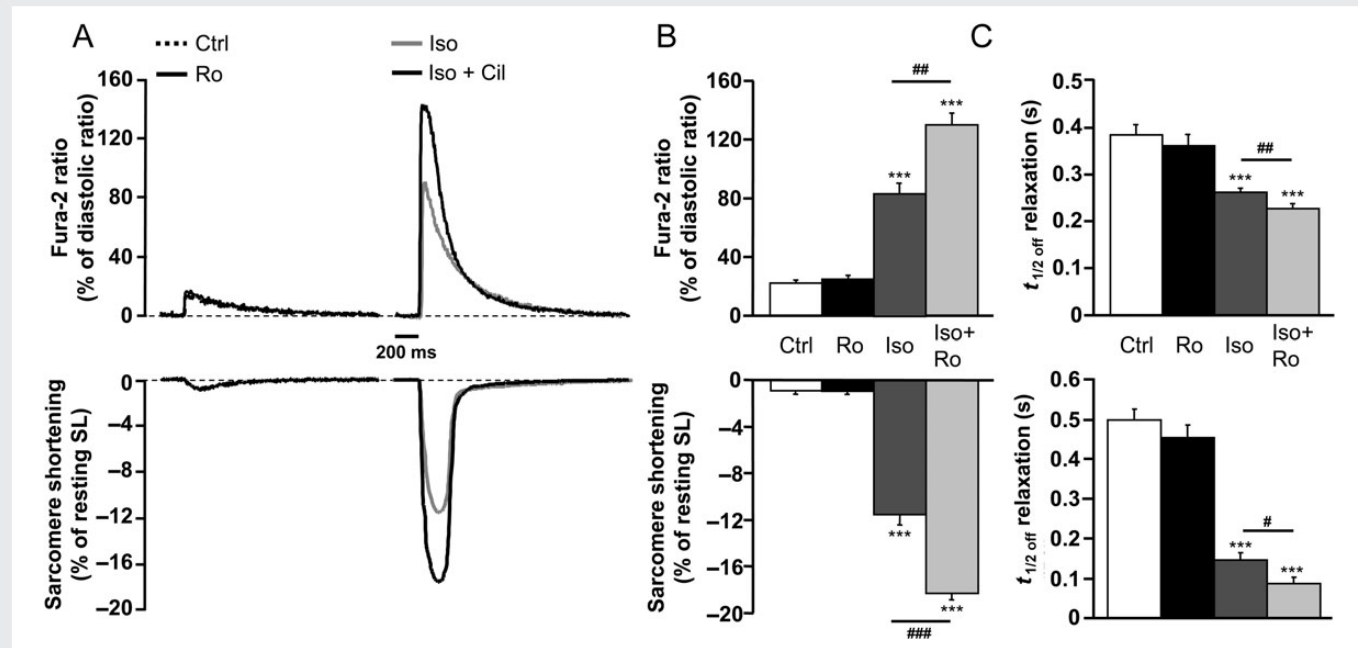


Figure 3 Effect of PDE4 inhibition on ECC in ARVMs. (A) Individual traces of Ca^{2+} transients (top) and sarcomere shortening (bottom) in Fura-2 loaded ARVMs paced at 0.5 Hz representing the effect of PDE4 inhibition by Ro (10 μM) (in black) under basal conditions (dashed lines) or after Iso stimulation (1 nM) (in grey). (B) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in control conditions (white bar, $n = 11$ cells, 6 rats), Ro (black bar, $n = 11$, 6 rats), Iso (dark grey bar, $n = 12$ cells, 6 rats), and Iso + Ro (light grey bar, $n = 12$ cells, 6 rats). (C) Average time-to-50% relaxation for Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) are presented for control, Ro, Iso, and Iso + Ro. Statistical significance is indicated as: *** $P < 0.001$; and # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ (one-way ANOVA, Newman–Keuls).

sarcomere shortening under basal conditions (Figure 3A and B and Supplementary material online, Tables S2 and S3). However, Ro strongly potentiated the effects of Iso (1 nM), further increasing the Ca^{2+} transient amplitude and sarcomere shortening by $\sim 60\%$ (Figure 3B). PDE4 inhibition also significantly accelerated the decay kinetics of both signals (Figure 3C).

We next examined the functional consequences of combinations of selective PDE inhibitors on cell contraction under basal conditions (Figure 4 and Supplementary material online, Table S2). As shown in Figure 4A and B, simultaneous inhibition of PDE2 and PDE4 by a combination of 100 nM Bay and 10 μM Ro (Bay + Ro) increased Ca^{2+} transients and sarcomere shortening, and slightly accelerated the relaxation kinetics of the twitch. However, comparison with Figure 1 shows that these effects were similar to that of individual PDE2 inhibition under basal conditions. In contrast, concomitant inhibition of PDE2 and PDE3 by 100 nM Bay and 1 μM Cil strongly increased the amplitude of Ca^{2+} transients and sarcomere shortening, and these effects were significantly larger than when either PDE2 or PDE3 alone were inhibited ($P < 0.05$ vs. Bay and Cil alone). The relaxation kinetics were significantly accelerated when compared with control (Figure 4C), and $t_{1/2 \text{ off}}$ values of sarcomere shortening were significantly smaller for Bay + Cil when compared with Bay alone (compare Figures 1C and 4C), but not when compared with Cil alone (compare Figures 2C and 4C). This suggests that PDE3 has a more prominent role in controlling cell relaxation than PDE2 under basal conditions. Concomitant inhibition of PDE3 and PDE4 by Cil + Ro had a major impact on ECC, increasing the amplitude of Ca^{2+} transients 2.5-fold, and sarcomere shortening 15-folds (Figure 4B). This was accompanied by a major acceleration of Ca^{2+} transients and cell shortening decay phases, which was significantly larger

than with Bay + Cil (Figure 4C). Furthermore, Cil + Ro doubled SR Ca^{2+} load and drastically increased fractional Ca^{2+} release from 40% in Ctrl or after PDE3 inhibition, to 80% when both PDE3 and PDE4 were inhibited (Figure 5). Finally, application of the broad spectrum PDE inhibitor IBMX (100 μM) had similar functional effects as a concomitant inhibition of PDE3 and PDE4.

3.2 Regulation of the phosphorylation status of key ECC proteins by PDEs

To get some insights into the molecular mechanisms by which individual PDE families regulate ECC in ARVMs, we examined the consequences of PDE inhibition on the phosphorylation of key ECC proteins. For this, we performed western blot analysis with phospho-specific antibodies directed against TnI, MyBP-C, PLB, RyR2, and $\text{Ca}_v1.2$ under basal conditions (Figure 6) or after a non-maximal β -AR stimulation by Iso (1 nM) (Figure 7). In line with ECC measurements, Figure 6 shows that global PDE inhibition with IBMX or concomitant inhibition of PDE3 and PDE4 by Cil + Ro led to a major increase in the phosphorylation of TnI (Figure 6A), MyBP-C (Figure 6B), PLB (Figure 6C), RyR2 (Figure 6D), and $\text{Ca}_v1.2$ (Figure 6E). Individual inhibition of PDE2 and PDE3, as well as simultaneous inhibition of PDE2 and PDE3 or PDE2 and PDE4, slightly but significantly increased the phosphorylation of TnI, whereas inhibition of PDE4 alone did not (Figure 6A). In contrast, MyBP-C phosphorylation was significantly increased by selective inhibition of PDE2, PDE3, or PDE4 and by their dual inhibition, especially in the case of PDE3 and PDE4 (Figure 6B). Selective PDE3 inhibition by Cil or simultaneous inhibition of PDE2 and PDE3 also increased significantly PLB phosphorylation, whereas individual or associated PDE2 and PDE4 inhibition did

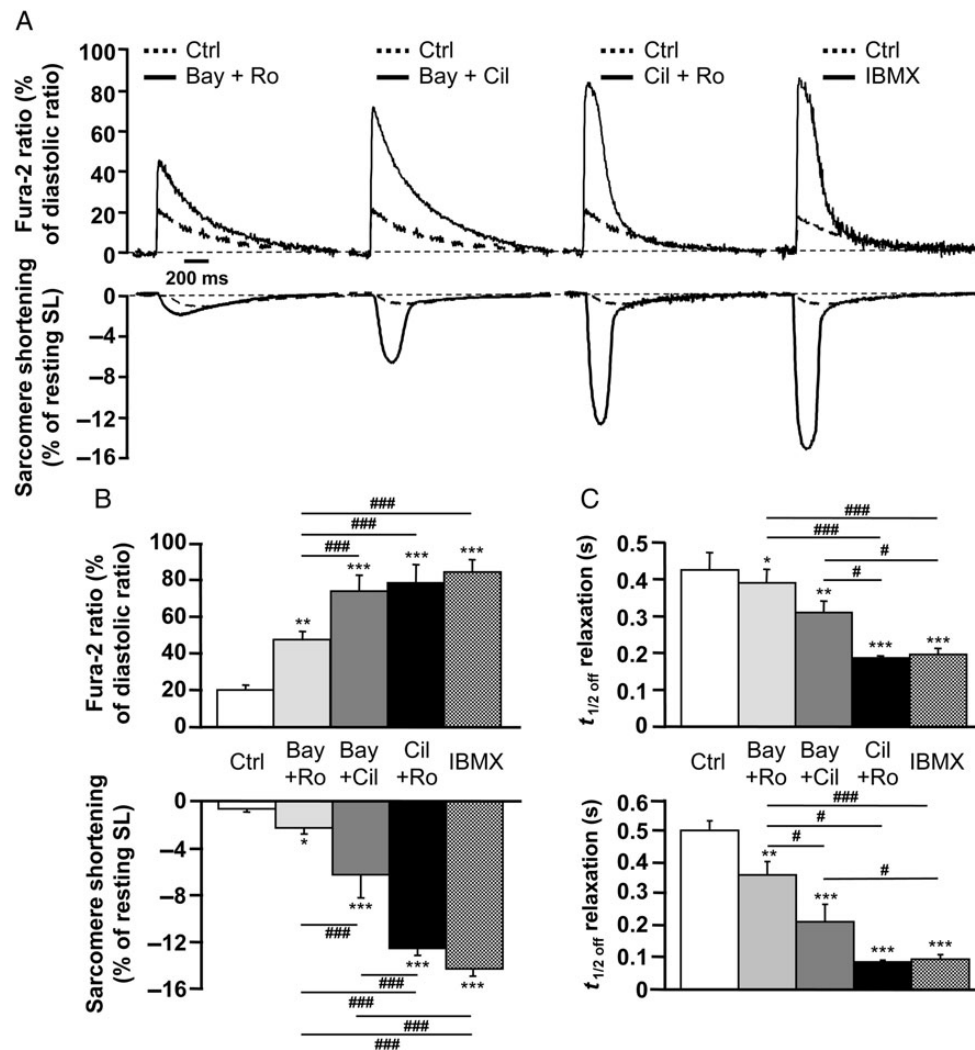


Figure 4 Effect of concomitant PDE inhibition on Ca^{2+} transients and cell contraction in ARVMs under basal conditions. (A) Representative traces of Ca^{2+} transients (top) and sarcomere shortening (bottom) obtained in Fura-2 loaded ARVMs paced at 0.5 Hz showing the effect of simultaneous PDE2 and PDE4 inhibition by Bay (0.1 μM) and Ro (10 μM) (Bay + Ro); PDE2 and PDE3 inhibition by Bay and cilostamide (1 μM) (Bay + Cil); PDE3 and PDE4 inhibition by Cil and Ro (Cil + Ro); and global PDE inhibition by IBMX (100 μM). (B) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in control conditions (white bar), or after concomitant PDE inhibition by Bay + Ro (light grey bar, $n = 14$ cells, 5 rats), Bay + Cil (dark grey bar, $n = 11$ cells, 4 rats), Cil + Ro (black bar, $n = 9$ cells, 4 rats) and IBMX (hatched bar, $n = 10$ cells, 3 rats). (C) Mean (\pm SEM) time-to-50% relaxation for Ca^{2+} decay (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) the same conditions as in (B). Statistical significance is indicated as: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; and # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ (one-way ANOVA, Newman–Keuls).

not (Figure 6C). The phosphorylation of $\text{Ca}_v1.2$ and RyR2 was only increased by simultaneous blockade of PDE3 and PDE4 or global PDE inhibition with IBMX (Figure 6D and E).

Figure 7 shows that, after a non-maximal β -AR stimulation by Iso, we observed a significant increase in the phosphorylation of TnI, MyBP-C, PLB, RyR2, and $\text{Ca}_v1.2$. A maximal level of phosphorylation was obtained by treatment of cells by Iso followed by IBMX (Figure 7). The effect of Iso on the phosphorylation of all of these proteins was potentiated by the selective inhibition of PDE4, in agreement with the results obtained on Ca^{2+} transients, sarcomere shortening, and relaxation kinetics. Similar results were obtained upon PDE3 inhibition, except that Cil only tended to increase the level of phosphorylation of TnI. In contrast, PDE2 inhibition only increased the phosphorylation of MyBP-C and $\text{Ca}_v1.2$ in the presence of Iso.

4. Discussion

It is well established that cardiac ECC is regulated by the cAMP/PKA pathway. Initiation of the pathway takes place at the sarcolemmal membrane by cAMP synthesis through the activity of adenylyl cyclases; termination of the pathway involves the activity of cyclic-nucleotide PDEs that are responsible for the hydrolysis of cAMP into 5'-AMP, and phosphatase activity that is responsible for PKA substrate dephosphorylation. At least five PDE families are reported to degrade cAMP in the heart.^{2,46} Comparison of the functional role of individual PDE families is possible by using pharmacological agents that selectively inhibit their activity. Since selective inhibitors of PDE1 and PDE8 are still lacking, we focused our attention on PDE2, PDE3, and PDE4 for which selective inhibitors exist. Using Bay to inhibit PDE2, Cil to

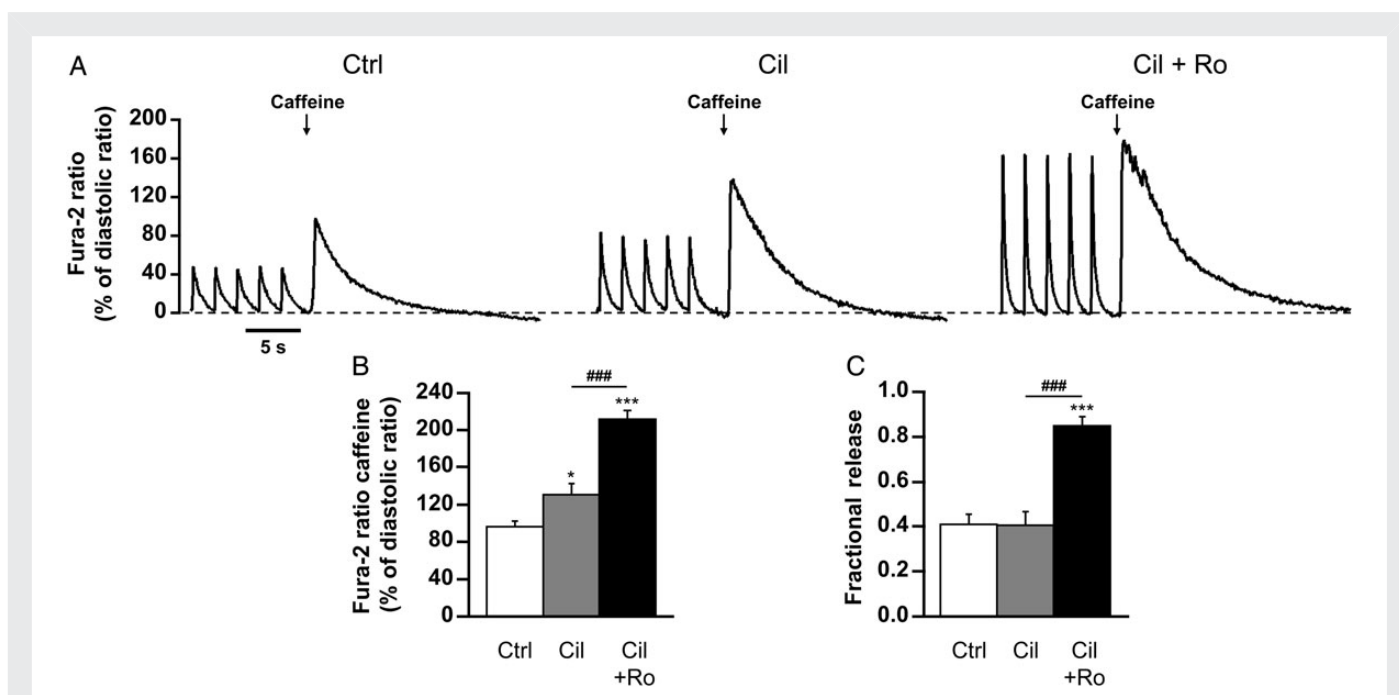


Figure 5 Effect of concomitant PDE3 and PDE4 inhibition on SR Ca^{2+} load and fractional release in ARVMs. (A) Representative traces of Ca^{2+} transients obtained with caffeine (10 mM) recorded in Fura-2 loaded ARVMs after pacing at 0.5 Hz, under basal conditions (Ctrl), upon PDE3 inhibition by Cil (1 μM), or PDE3 and PDE4 inhibition by Cil and Ro (10 μM) (Ro + Cil). (B) Mean amplitude (\pm SEM) of calcium transients induced by caffeine (10 mM) estimating SR Ca^{2+} content in Ctrl (white bar, $n = 8$ cells, 3 rats), Cil (grey bar, $n = 8$ cells, 3 rats), and Cil + Ro (black bar, $n = 9$ cells, 3 rats). (C) Average fractional release (\pm SEM) in Ctrl (white bar, $n = 8$ cells, 3 rats), Cil (grey bar, $n = 8$ cells, 3 rats), and Cil + Ro (black bar, $n = 9$ cells, 3 rats). Statistical significance is indicated as: * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (vs. control cells), and ### $P < 0.001$ (vs. Cil treated cells) (one-way ANOVA, Newman–Keuls).

inhibit PDE3, and Ro to inhibit PDE4, as well as the broad spectrum PDE inhibitor (IBMX), we explored the role of these three PDEs in three different sets of experimental conditions (at basal, upon β -AR stimulation, and upon dual inhibition), and on nine different parameters: PKA phosphorylation level of TnI, MyBP-C, PLB, RyR2, and $\text{Ca}_v1.2$; amplitude and relaxation kinetics of sarcomere shortening and Ca^{2+} transients. It is known that cAMP signals induced by β -AR stimulation also activate the Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), which phosphorylates some of the main PKA substrates.⁴⁷ Thus, it is conceivable that some of the effects of the PDE inhibitors are due to the activation of CaMKII. However, inhibition of this kinase by KN-93 (1 μM) did not alter the positive inotropic effects of IBMX (Supplementary material online, Figure S2), suggesting that PKA is the main effector of the increased Ca^{2+} transients and sarcomere shortening observed upon PDE inhibition.

Our results indicate that only PDE2 and PDE3 appear to regulate ECC under basal conditions. However, upon β -AR stimulation, individual inhibition either of PDE2, PDE3, or PDE4 potentiates the β -AR response of Ca^{2+} transient and cell contraction to a similar extent. This suggests that PDE2 and PDE3 are active in basal conditions, whereas PDE4 becomes activated upon β -AR stimulation or PDE3 inhibition.

In ARVMs, biochemical and functional measurements indicate that PDE3 and PDE4 are the major PDEs degrading cAMP.^{12,14,23} Accordingly, experiments shown here indicate that PDE3 and PDE4 dominate. This is especially true for the control of the SR Ca^{2+} load (Figure 5), which determines Ca^{2+} transient amplitude.⁴⁸ Interestingly, while PDE3 inhibition alone does not increase fractional release (probably because it affects only SR Ca^{2+} load), the combination Cil and Ro have a tremendous effect on this parameter. This can be explained by the increased

$I_{\text{Ca,L}}$ amplitude¹⁴ and RyR2 open probability, leading to an increase of the gain of ECC⁴⁹ occurring only when both PDEs are inhibited. Hence, inhibition of these two PDEs induces a massive phosphorylation of ECC proteins, and a large increase in Ca^{2+} transients and sarcomere shortening (Figures 4 and 6). Other dual combinations of PDE inhibition had much smaller effects on protein phosphorylation and ECC, indicating that PDE3 and PDE4 can compensate for each other, and that their function is partially redundant.

Although PDE2 represents only a few per cents of total hydrolytic activity in ARVMs,¹² we show here that it regulates basal and β -AR-stimulated ECC. This is consistent with previous studies, showing that PDE2 modulates cAMP levels and β -AR responses in rodent cardiac myocytes.^{23,33} In particular, PDE2 modulates the β -AR regulation of the L-type Ca^{2+} current ($I_{\text{Ca,L}}$) in cardiac myocytes,²³ thus providing a possible mechanism for the effects of PDE2 inhibition on Iso-stimulated Ca^{2+} transients and contraction. In contrast, the mechanism by which PDE2 regulates basal ECC is less clear since PDE2 inhibition has no effect on basal $I_{\text{Ca,L}}$ in ARVMs.²³ MyBP-C could participate in the effects of PDE2 on basal ECC by increasing cross-bridge cycling and myofilament Ca^{2+} sensitivity.⁵⁰

In contrast to PDE4, selective PDE3 inhibition increased the amplitude and relaxation kinetics of Ca^{2+} transients and sarcomere shortening under basal conditions (Figure 2), and this was associated with enhanced phosphorylation of PLB, TnI, and MyBP-C but not $\text{Ca}_v1.2$ or RyR2 (Figure 6). These data are in line with previous findings, showing a subcellular localization of PDE3 in SR-enriched membrane fraction^{51,52} and the positive effects of PDE3 inhibitors on SR Ca^{2+} uptake and SR Ca^{2+} content.^{26–28} This is also consistent with the lack of effect of selective PDE3 inhibition on basal $I_{\text{Ca,L}}$ in ARVMs.²³

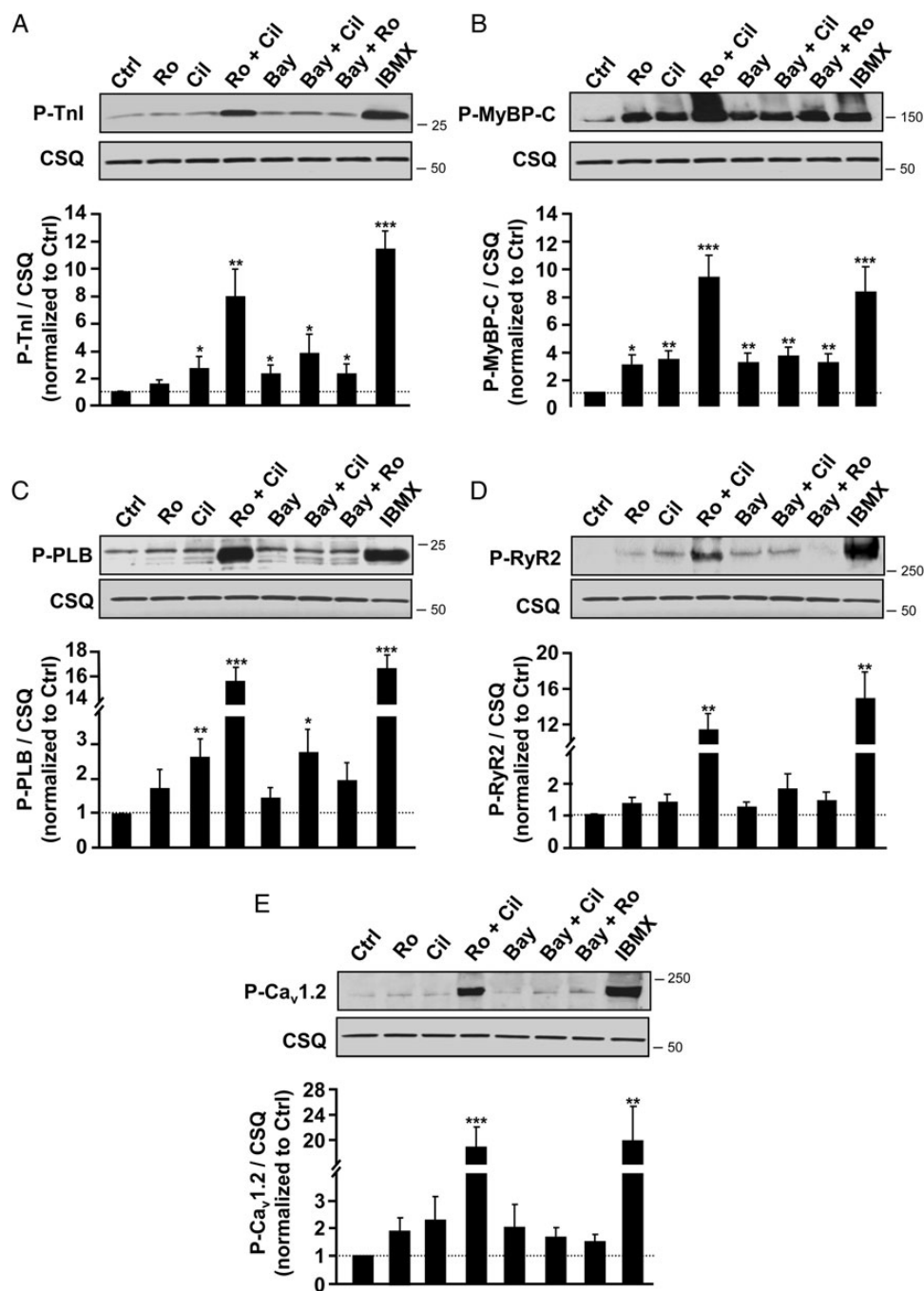


Figure 6 Effect of PDE inhibitors on phosphorylation of key ECC proteins in basal conditions. Unstimulated ARVMs were treated or not with Ro (10 μ M), Cil (1 μ M), Ro + Cil, Bay (0.1 μ M), Bay + Cil, Bay + Ro, and IBMX (100 μ M) as indicated for 15 min. Whole proteins were extracted and 50 μ g of proteins were analysed by western blot using antibodies for phospho-Tnl (P-Tnl) (A), phospho-myosine-binding protein C (P-MyBP-C) (B), phospho-PLB (P-PLB) (C), phospho-ryanodine receptor (P-RyR2) (D), and phospho-Ca_v1.2 (E). The membranes were stripped and reprobed with CSQ antibodies used as a loading control. A representative blot is shown, and at least five separate experiments were performed ($n = 6$ for P-Tnl, $n = 5$ for P-MyBP-C, $n = 6$ for P-PLB, $n = 5$ for P-RyR, and $n = 5$ for P-Ca_v1.2), giving similar results. Phosphorylated proteins/CSQ ratios were quantified, expressed as means \pm SEM and normalized to untreated ARVMs (Ctrl). Statistical significance is indicated as: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (one-way ANOVA, Newman–Keuls).

In the present study, we established that PDE2, PDE3, and PDE4 have distinct roles in controlling ECC. In the absence of hormonal stimulation, when intracellular cAMP concentration is low, PDE2 and especially PDE3 are dominant to control cardiac contraction. PDE3 contribution

to the degradation of basal cAMP could be explained by its high affinity for cAMP ($K_m < 1 \mu$ M).⁵³ For PDE2, the scheme must be different because of its low affinity for cAMP. Nonetheless, under basal conditions, localized production of cGMP may occur to activate PDE2 by

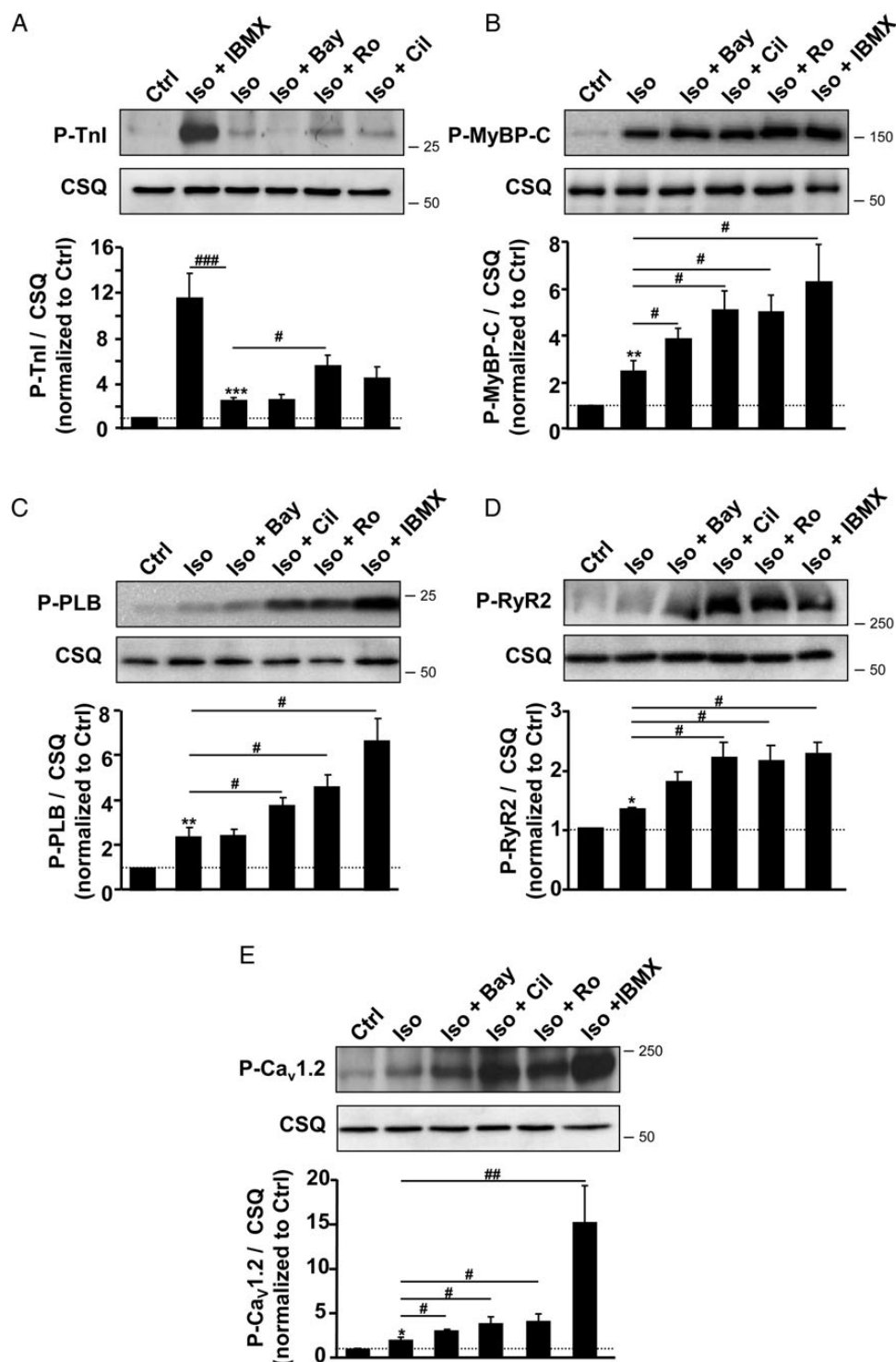


Figure 7 Effect of PDE inhibition on the phosphorylation of key ECC proteins under β -AR stimulation. ARVMs were treated for 10 min with Iso (1 nM, Iso) followed by 10 min treatment with PDE inhibitors Bay (0.1 μ M), Cil (1 μ M), Ro (10 μ M), or IBMX (100 μ M). Representative western blots of cardiac myocyte lysates probed for phospho-TnI (P-TnI) (A), phospho-myosine-binding protein C (P-MyBP-C) (B), P-PLB (C), phospho-ryanodine receptor (P-RyR2) (D), and phospho-Ca_v1.2 (E). The membranes were stripped and reprobed with CSQ antibodies used as a loading control. A representative blot is shown, and at least five separate experiments were performed ($n = 5$ for P-TnI, $n = 7$ for P-MyBP-C, $n = 6$ for P-PLB, $n = 6$ for P-RyR, and $n = 5$ for P-Ca_v1.2), giving similar results. Phosphorylated proteins/CSQ ratios were quantified, expressed as means \pm SEM, and normalized to untreated ARVMs (Ctrl). Statistical significance is indicated as: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; and # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ (one-way ANOVA, Newman-Keuls).

binding to its regulatory cGMP-specific phosphodiesterase, adenylyl cyclases, and FhIA-B domain.⁵⁴ PDE2 activation mediated by cGMP could exacerbate its role in controlling cAMP levels regulating ECC as recently reported in cardiomyocytes.⁵⁵ When cAMP levels are increased, PDE4 turns on and becomes crucial to control global cAMP homeostasis and ECC. However, despite a modest effect on the cAMP level, inhibition of PDE2 and PDE3 also enhances β -AR inotropic and lusitropic effects, demonstrating that PDE2, PDE3, and PDE4 act in concert to modulate β -AR stimulation of cardiac contraction. Interestingly, although cardiotonic drugs such as milrinone produce beneficial inotropic effects upon acute administration,⁵⁶ these agents increase mortality in patients with dilated cardiomyopathy upon chronic treatment.⁵⁷ A challenge of future research will be to determine the molecular mechanisms that underlie long-term detrimental effects of PDE inhibitors in heart failure in order to design new therapeutic approaches to enhance the beneficial effects and to suppress detrimental long-term effects of PDE inhibitors.

5. Limitations

The present study focused on the role of three different PDE families in controlling the ECC in isolated ARVMs. It is known that the expression level of these PDEs varies among different species and is dependent on the development stage and on the cardiac territory investigated.³² However, PDE expression is relatively conserved between murine models and human.⁵⁸ In the mammalian heart, PDE3 and PDE4 remain the two major enzymes degrading cAMP and controlling cardiac ECC. Thus, even if our results might not be fully transposable to any cellular cardiac models or human heart, we unveil how cardiac function is finely tuned by these PDE families. Furthermore, their expression and distribution are altered under pathophysiological conditions.⁵⁹ Therefore, the relative contribution of PDE2, PDE3, and PDE4 to compartmentalize cAMP signals and to maintain specific PKA phosphorylation of the key ECC proteins is most probably differently affected in various cardiac diseases. Future studies investigating their participation in pathological conditions are necessary to design new therapeutic strategies targeting PDEs.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

The authors wish to thank Florence Lefebvre and Aurore Germain for technical assistance with cardiomyocyte isolation, and Dr Andrew R. Marks (Columbia University, USA) for kindly providing the RyR2 phosphospecific antibody.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by Leducq cAMP grant 06CVD02 (to R.F.), by European Union contract LSHM-CT-2005-018833/EUGeneHeart (to R.F.), the Fondation de France (to G.V.), the Agence Nationale de la Recherche 2010 BLAN 1139-01 (to G.V.), the Fondation pour la Recherche Médicale (to R.F.), the Société Française de Cardiologie (to J.L.), the Investment for the Future program ANR-11-IDEX-0003-01 within the LABEX ANR-10-LABX-0033 (to R.F.) and a PhD grant from Ile de France CORDDIM (to P.B.).

References

- Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Ann Rev Physiol* 2008;**70**: 23–49.
- Conti M, Beavo JA. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Ann Rev Biochem* 2007;**76**: 481–511.
- Patrucco E, Albergine MS, Santana LF, Beavo JA. Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**49**: 330–333.
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* 1998;**273**:15553–15558.
- Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1998;**273**: 15559–15564.
- Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 2006;**109**:366–398.
- Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: from molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006;**58**:488–520.
- Méry P-F, Pavoiné C, Pecker F, Fischmeister R. Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 1995;**48**:121–130.
- Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, van Staveren W *et al*. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 2004;**47**:1081–1092.
- Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet J-L *et al*. Negative feedback exerted by PKA and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes. An in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem* 2004;**279**:52095–52105.
- Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A *et al*. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* 2004;**95**:65–75.
- Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DMF, Conti M *et al*. A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different G_s -coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 2006;**98**:1081–1088.
- Nikolaev VO, Bunemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching β_1 -adrenergic but locally confined β_2 -adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* 2006;**99**:1084–1091.
- Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechêne P, Mazet J-L *et al*. Spatio-temporal dynamics of β -adrenergic cAMP signals and L-type Ca^{2+} channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res* 2008;**102**: 1091–1100.
- Fischmeister R, Castro LRV, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevičius J, Leroy J *et al*. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 2006;**99**:816–828.
- Scott JD, Santana LF. A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation* 2010;**121**:1264–1271.
- Lehnart SE, Wehrens XH, Marks AR. Defective ryanodine receptor interdomain interactions may contribute to intracellular Ca^{2+} leak: a novel therapeutic target in heart failure. *Circulation* 2005;**111**:3342–3346.
- Kerfant BG, Zhao D, Lorenzen-Schmidt I, Wilson LS, Cai S, Chen SR *et al*. PI3KY is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ Res* 2007;**101**:400–408.
- Hartzell HC, Fischmeister R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca^{2+} current in single heart cells. *Nature* 1986;**323**:273–275.
- Malecot C, Bers DM, Katzung BG. Biphasic contractions induced by milrinone at low temperature in ferret ventricular muscle: role of the sarcoplasmic reticulum and transmembrane calcium influx. *Circ Res* 1986;**59**:151–162.
- Rivet-Bastide M, Vandecasteele G, Hatem S, Verde I, Benardeau A, Mercadier JJ *et al*. cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *J Clin Invest* 1997;**99**:2710–2718.
- Kajimoto K, Hagiwara N, Kasanuki H, Hosoda S. Contribution of phosphodiesterase isozymes to the regulation of the L-type calcium current in human cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 1997;**121**:1549–1556.
- Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1999;**127**:65–74.
- Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca^{2+} channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* 2001;**533**:329–340.
- Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LRV, Abi-Gerges A, Xie M *et al*. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca^{2+} channel complex regulates Ca^{2+} current and protects against ventricular arrhythmias. *J Clin Invest* 2011;**121**:2651–2661.
- Yano M, Kohno M, Ohkusa T, Mochizuki M, Yamada J, Kohno M *et al*. Effect of milrinone on left ventricular relaxation and Ca^{2+} uptake function of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;**279**:H1898–H1905.

27. Xiong W, Ferrier GR, Howlett SE. Diminished inotropic response to amrinone in ventricular myocytes from myopathic hamsters is linked to depression of high-gain Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**310**:761–773.
28. Beca S, Ahmad F, Shen W, Liu J, Makary S, Polidovitch N et al. PDE3A regulates basal myocardial contractility through interacting with SERCA2a-signaling complexes in mouse heart. *Circ Res* 2013;**112**:289–297.
29. Harrison SA, Reifsnnyder DH, Gallis B, Cadd GG, Beavo JA. Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardio-tonic drugs. *Mol Pharmacol* 1986;**29**:506–514.
30. Weishaar RE, Kobylarz-Singer DC, Steffen RP, Kaplan HR. Subclasses of cyclic AMP-specific phosphodiesterase in left ventricular muscle and their involvement in regulating myocardial contractility. *Circ Res* 1987;**61**:539–547.
31. Komaz N, Lugnier C, Le Bec A, Serradeil-Le Gal C, Barthelemy G, Stoclet JC. Differential sensitivity to cardiotonic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;**14**:213–220.
32. Osadchii OE. Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;**21**:171–194.
33. Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR et al. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts β -adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* 2006;**98**:226–234.
34. Muller B, Lugnier C, Stoclet JC. Involvement of rolipram-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase in the regulation of cardiac contraction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;**16**:796–803.
35. Katano Y, Endoh M. Cyclic AMP metabolism in intact rat ventricular cardiac myocytes—interaction of carbachol with isoproterenol and 3-isobutyl-1-methylxanthine. *Mol Cell Biochem* 1993;**119**:195–201.
36. Katano Y, Endoh M. Differential effects of Ro 20–1724 and isobutylmethylxanthine on the basal force of contraction and beta-adrenoceptor-mediated response in the rat ventricular myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;**167**:123–129.
37. Christ T, Galindo-Tovar A, Thoms M, Ravens U, Kaumann AJ. Inotropy and L-type Ca^{2+} current, activated by β_1 - and β_2 -adrenoceptors, are differently controlled by phosphodiesterases 3 and 4 in rat heart. *Br J Pharmacol* 2009;**156**:62–83.
38. Herzer WA, Thomas NJ, Carcillo JA, Tofovic SP, Jackson EK. Effects of type IV phosphodiesterase inhibition on cardiac function in the presence and absence of catecholamines. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;**32**:769–776.
39. Juan-Fita MJ, Vargas ML, Hernandez J. Comparative actions of diazepam and other phosphodiesterase inhibitors on the effects of noradrenaline in rat myocardium. *Pharmacol Toxicol* 2003;**93**:23–28.
40. Beavo JA, Francis SH, Houslay MD. *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group 2007; pp. 1–713.
41. Hidaka H, Hayashi H, Kohri H, Kimura Y, Hosokawa T, Igawa T et al. Selective inhibitor of platelet cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase, cilostamide, inhibits platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther* 1979;**211**:26–30.
42. Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, Kimura Y et al. Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol* 2000;**59**:347–356.
43. Rose RJ, Liu H, Palmer D, Maurice DH. Cyclic AMP-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic AMP phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol* 1997;**122**:233–240.
44. Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J, Karpen JW. In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* 2001;**118**:63–77.
45. Hulme JT, Lin TW, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA. β -adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac $\text{Ca}_v1.2$ channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:13093–13098.
46. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M et al. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 2004;**118**:375–387.
47. Grimm M, Brown JH. β -Adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:322–330.
48. Trafford AW, Diaz ME, Eisner DA. Stimulation of Ca-induced Ca release only transiently increases the systolic Ca transient: measurements of Ca fluxes and sarcoplasmic reticulum Ca. *Cardiovasc Res* 1998;**37**:710–717.
49. Ginsburg KS, Bers DM. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger. *J Physiol* 2004;**556**:463–480.
50. Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, Lezoualc'h F. The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**:14144–14149.
51. Lugnier C, Muller B, Lebec A, Beaudry C, Rousseau E. Characterization of indolidine-sensitive and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;**265**:1142–1151.
52. Movsesian MA. Beta-adrenergic receptor agonists and cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: Shifting the focus from inotropy to cyclic adenosine monophosphate. *J Am Coll Cardiol* 1999;**34**:318–324.
53. Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;**66**:241–277.
54. Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG et al. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:13260–13265.
55. Stangherlin A, Gesellchen F, Zoccarato A, Terrin A, Fields LA, Berrera M et al. cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res* 2011;**108**:929–939.
56. Konstam MA, Cody RJ. Short-term use of intravenous milrinone for heart failure. *Am J Cardiol* 1995;**75**:822–826.
57. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 1991;**325**:1468–1475.
58. Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA, Conti M. Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol* 2011;**106**:249–262.
59. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2012;**52**:323–329.

Supplementary Material

Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes

Delphine Mika^{1,2}, Pierre Bobin^{1,2}, Martine Pomérance^{1,2}, Patrick Lechêne^{1,2}, Ruth Westenbroek³, William A. Catterall³, Grégoire Vandecasteele^{1,2*}, Jérôme Leroy^{1,2}, and Rodolphe Fischmeister^{1,2*}

¹INSERM UMR-S 769, Châtenay-Malabry, France

²University Paris-Sud, Faculty of Pharmacy, LabEx LERMIT, DHU TORINO, IFR141, Châtenay-Malabry, France

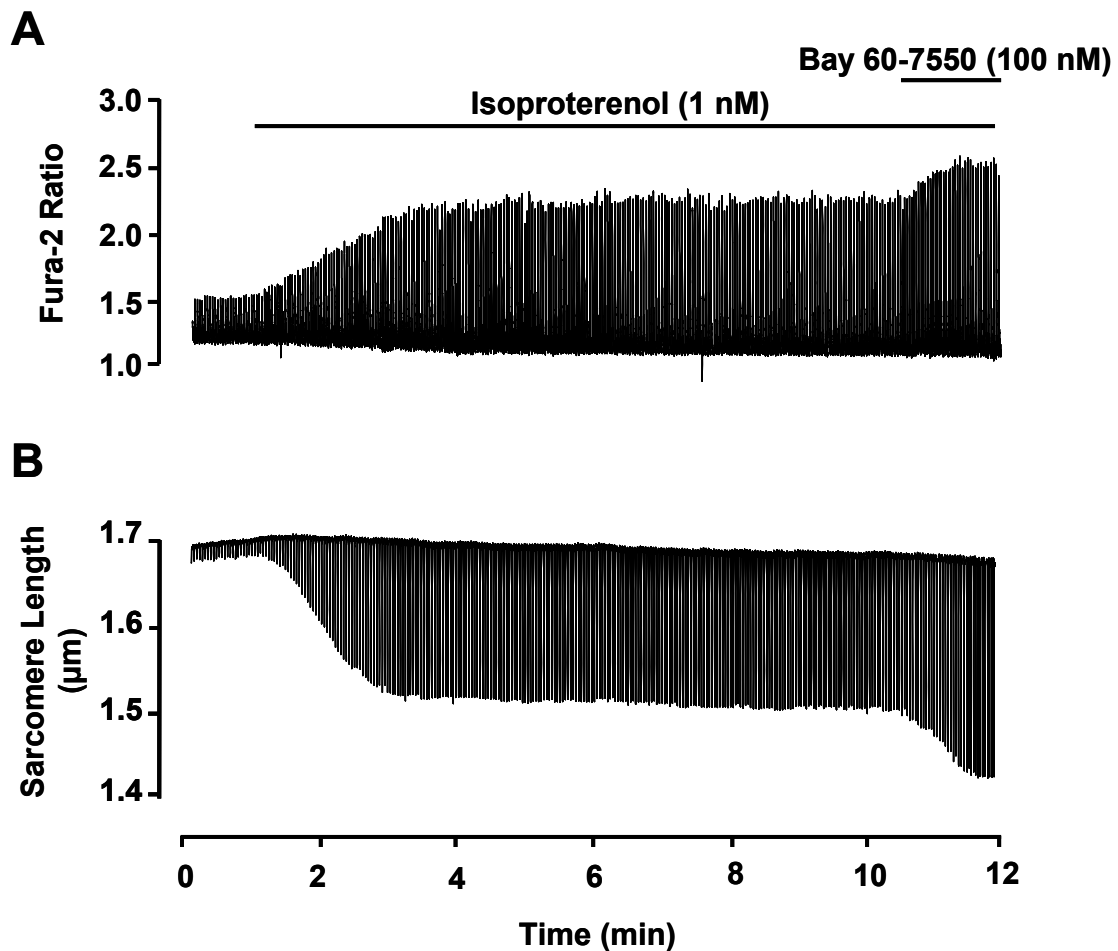
³University of Washington School of Medicine, Department of Pharmacology, Seattle, WA 98195-7280, USA

Short title: cAMP PDEs and cardiac EC coupling

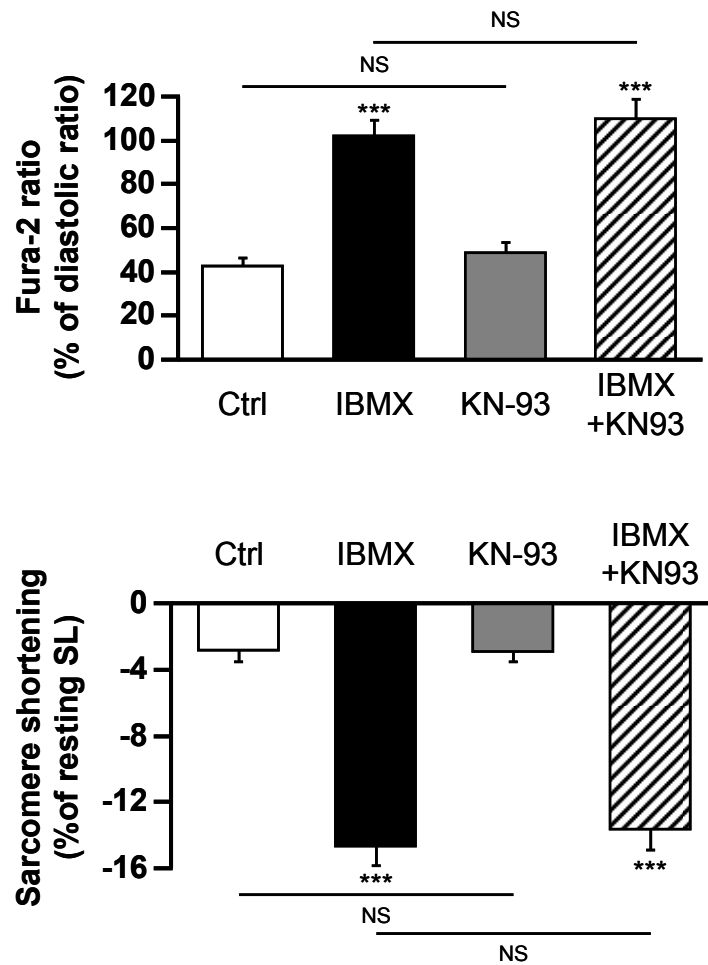
*Corresponding authors: Tel. +33-1-46.83.57.71 – Fax: +33-1.46.83.54.75.

Email: gregoire.vandecasteele@u-psud.fr or rodolphe.fischmeister@inserm.fr

Supplemental Figures



Supplemental Figure 1 Representative traces of Ca^{2+} transients and sarcomere shortening of ARVMs. Raw traces of Ca^{2+} transients (A) and sarcomere shortening (B) simultaneously recorded in individual Fura-2 loaded ARVMs paced at 0.5 Hz. The solid bars indicate application of isoprenaline (Iso, 1 nM) and Iso+Bay 60-7550 (100 nM).



Supplemental Figure 2 The effect of PDE inhibition on Ca^{2+} transients and cell contraction in ARVMs is not affected by CaMKII inhibition. (A) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca^{2+} transients (top, in % of diastolic ratio) and sarcomere shortening (bottom, in % of resting sarcomere length, SL) obtained in Fura-2 loaded ARVMs paced at 0.5 Hz under basal conditions (Ctrl ; white bars, $n=18$ cells, 8 rats), upon CaMKII inhibition (KN-93, 1 μM , grey bars, $n=12$ cells, 3 rats), non specific PDE inhibition by IBMX (100 μM) alone (black bars, $n=18$ cells, 8 rats) or associated with CaMKII inhibition (KN-93 + IBMX, hatched bars, $n=12$ cells, 3 rats). Statistical significance is indicated as: NS, non significant; ***, $p < 0.001$ (One-way ANOVA, Newman-Keuls).

Supplemental Table 1: Selectivity of cardiac cAMP PDE Inhibitors

Inhibitors	PDE2	PDE3	PDE4
Bay 60-7550	0.0047 ¹	>4 ¹	1.8 ¹
Cilostamide	15 ²	0.042 ²	80 ²
Ro 20-1724	>200 ²	>200 ²	2 ³

The inhibition constants K_i of each PDE inhibitor are reported in μM for each PDE family.

Supplemental Table 2: Effect of PDE inhibition on diastolic and systolic sarcomere length under basal conditions or after β -AR stimulation

Stimulation	Ctrl	Bay	Cil	Ro	Bay + Ro	Bay + Cil	Cil +Ro	IBMX	Iso	Iso + Bay	Iso+Cil	Iso + Ro
Diastolic SL (μm)	1.681 \pm 0.006	1.682 \pm 0.009	1.687 \pm 0.021	1.700 \pm 0.012	1.687 \pm 0.010	1.679 \pm 0.011	1.668 \pm 0.011	1.665 \pm 0.022	1.687 \pm 0.008	1.679 \pm 0.016	1.630 \pm 0.019	1.645 \pm 0.020
Systolic SL (μm)	1.668 \pm 0.004	1.650 \pm 0.011	1.636 \pm 0.023	1.686 \pm 0.013	1.655 \pm 0.013	1.567 \pm 0.039	1.462 \pm 0.021	1.427 \pm 0.025	1.511 \pm 0.013	1.429 \pm 0.021	1.360 \pm 0.030	1.344 \pm 0.024
ΔSL (μm)	0.013 \pm 0.001	0.032 \pm 0.007	0.051 \pm 0.013	0.013 \pm 0.004	0.032 \pm 0.008	0.112 \pm 0.033	0.206 \pm 0.019	0.238 \pm 0.013	0.175 \pm 0.012	0.250 \pm 0.025	0.270 \pm 0.021	0.301 \pm 0.022
Sarcomere shortening (%)	0.78 \pm 0.05	1.90 \pm 0.30	3.05 \pm 0.69	0.79 \pm 0.17	1.87 \pm 0.37	6.70 \pm 2.02	12.35 \pm 1.27	14.32 \pm 1.39	10.37 \pm 0.56	14.80 \pm 0.88	16.60 \pm 1.37	18.28 \pm 1.13
Number of cells/rats	95/17	24/4	16/3	11/6	14/5	11/4	9/4	10/3	62/10	11/4	9/3	12/6

Individual cardiac myocytes were superfused for few minutes with control Ringer solution and then challenged with PDE inhibitors (single: Bay 60-7550, Bay, 100 nM; cilostamide, Cil, 1 μM ; Ro 20-1724, Ro, 10 μM or IBMX, 100 μM ; or combinations: Bay + Ro, Bay + Cil or Cil + Ro) during 15 min or with isoprenaline (Iso, 1 nM) during 10 min followed by 10 min treatment with PDE inhibitors (Bay, Cil or Ro). Diastolic and systolic sarcomere length (SL), ΔSL (diastolic SL-systolic SL), and sarcomere shortening ($\Delta\text{SL}/\text{diastolic SL} \times 100$) are expressed as mean \pm SEM for each stimulation.

Supplemental Table 3: Effect of PDE inhibition on diastolic and systolic calcium levels under basal conditions or after β -AR stimulation

Stimulation	Ctrl	Bay	Cil	Ro	Bay + Ro	Bay + Cil	Cil + Ro	IBMX	Iso	Iso + Bay	Iso+Cil	Iso + Ro
Diastolic Fura-2 ratio	1.178 \pm 0.019	1.140 \pm 0.034	1.079 \pm 0.045	1.138 \pm 0.055	1.109 \pm 0.037	1.129 \pm 0.032	1.170 \pm 0.056	1.162 \pm 0.049	1.194 \pm 0.043	1.033 \pm 0.023	1.105 \pm 0.035	1.152 \pm 0.087
Systolic Fura-2 ratio	1.467 \pm 0.031	1.645 \pm 0.058	1.580 \pm 0.073	1.419 \pm 0.081	1.629 \pm 0.083	2.027 \pm 0.107	2.083 \pm 0.100	2.130 \pm 0.119	2.315 \pm 0.089	2.286 \pm 0.142	2.576 \pm 0.126	2.734 \pm 0.022
ΔR	0.289 \pm 0.015	0.505 \pm 0.042	0.500 \pm 0.060	0.282 \pm 0.033	0.520 \pm 0.063	0.898 \pm 0.099	0.913 \pm 0.080	0.968 \pm 0.092	1.121 \pm 0.065	1.253 \pm 0.145	1.471 \pm 0.095	1.583 \pm 0.136
Fura-2 ratio (%)	24.07 \pm 1.105	44.66 \pm 3.55	47.65 \pm 6.49	24.49 \pm 2.43	46.79 \pm 5.28	80.09 \pm 8.65	79.18 \pm 7.74	83.56 \pm 7.44	96.69 \pm 5.457	122.41 \pm 14.5	132.2 \pm 5.93	136.8 \pm 3.74
Number of cells/rats	95/17	24/4	16/3	11/6	14/5	11/4	9/4	10/3	62/10	11/4	9/3	12/6

Individual cardiac myocytes were superfused for few minutes with control Ringer solution and then challenged with PDE inhibitors (single: Bay 60-7550, Bay, 100 nM; cilostamide, Cil, 1 μ M; Ro 20-1724, Ro, 10 μ M or IBMX, 100 μ M; or combinations: Bay + Ro, Bay + Cil or Cil + Ro) during 15 min or with Isoproterenol (Iso, 1 nM) during 10 min followed by 10 min treatment with PDE inhibitors (Bay, Cil or Ro). Diastolic and systolic Fura-2 ratio, ΔR (systolic Fura-2 ratio-diastolic Fura-2 ratio), and Fura-2 ratio (%) (ΔR /diastolic Fura-2 ratio*100) are expressed as mean \pm SEM for each stimulation.

Supplemental References

1. Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, van Staveren W, *et al.* Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 2004;**47**:1081-1092.
2. Lugnier C, Komasa N. Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J* 1993;**14 (Suppl I)**:141-148.
3. Sheppard H, Tsien WH. Alterations in the hydrolytic activity, inhibitor sensitivity and molecular size of the rat erythrocyte cyclic AMP phosphodiesterase by calcium and hypertonic sodium chloride. *J Cyclic Nucleotide Res* 1975;**1**:237-42.

C. Conclusions

L'implication de chaque famille de PDE dans la régulation du CEC a été déterminée par l'utilisation d'agents pharmacologiques qui inhibent sélectivement leur activité. Parce qu'il n'existait pas à l'époque d'inhibiteur sélectif des PDE1 et PDE8, le Bay 60-7550, le cilostamide et le Ro 20-1724 ont été utilisés comme inhibiteurs sélectifs respectifs de PDE2, PDE3 et PDE4, ainsi que l'IBMX, inhibiteur non spécifique des PDE. Ainsi, nous avons déterminé le rôle respectif de chacune de ces familles dans la régulation des niveaux d'AMPc dans des conditions basales ou après stimulation β -AR par une concentration submaximale d'isoprénaline (1 nM), des transitoires calciques et du raccourcissement cellulaire, et leur contribution dans la modulation de la phosphorylation par la PKA des protéines clés du CEC, dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés de rats adultes.

Nous mettons en évidence le rôle des PDE2 et surtout l'importance des PDE3 dans la régulation du CEC cardiaque en conditions basales. L'inhibition de PDE2 et PDE3 augmente en effet l'amplitude des transitoires Ca^{2+} et du raccourcissement cellulaire basal tout en accélérant leurs cinétiques de relaxation. Si l'inhibition des PDE4, dont l'activité totale est supérieure à celle de PDE3 dans les cardiomyocytes de rat adulte, présente des effets négligeables sur le CEC dans les conditions basales, nous montrons que son rôle devient crucial quand les taux d'AMPc dans la cellule sont augmentés, comme dans le cas d'une inhibition de PDE3, ou durant une stimulation β -AR. En outre, nous avons montré dans cette étude que l'inhibition non-sélective des PDE entraîne des effets très importants sur le CEC cardiaque et la phosphorylation de l'ensemble des protéines étudiées. Ceci se traduit par une très forte augmentation de l'amplitude des transitoires Ca^{2+} , du raccourcissement cellulaire et des cinétiques de décroissance associées. Ces effets étudiés en l'absence d'une stimulation β -AR sont essentiellement dus à l'activation de la PKA, l'inhibition de la CaMKII n'altérant pas les effets inotropes positifs de l'IBMX.

II. Caractérisation des arythmies induites par l'inhibition des PDE4

A. Introduction

Plusieurs études montrent la survenue d'arythmies lorsque l'activité des PDE est réduite. C'est le cas des PDE4 qui représentent l'isoforme majoritaire dans la dégradation des signaux AMPc produits lors de stimulations β -AR comme montré lors de l'étude présentée précédemment (Mika et al. 2013). Cette augmentation du risque de développer des arythmies lors d'une suppression de l'activité des PDE4 a été montrée dans des souris présentant une délétion de gènes codant pour certaines isoformes de PDE4. Ainsi, les souris PDE4B^{-/-} comme les souris PDE4D^{-/-} présentent une susceptibilité accrue aux arythmies induites par un stress catécholaminergique (Lehnart et al. 2005 ; Leroy et al. 2011). Afin de caractériser ces arythmies observées *in vivo* lorsque l'activité des PDE4 est diminuée et lors d'un stress catécholaminergique, j'ai dans un premier temps réalisé des enregistrements de potentiels d'action ainsi que du potentiel membranaire au repos sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat.

B. Résultats

La **Figure 1** représente les effets moyens d'une stimulation β -AR avec ou sans inhibition concomitante des PDE4 sur le potentiel de membrane de cardiomyocytes ventriculaires de rat enregistrés avec la technique de patch clamp en configuration cellule entière. Si le potentiel de membrane de repos reste stable en condition Ctrl, une stimulation β -AR provoque des DADs dont la fréquence d'apparition est augmentée de manière significative lors d'une inhibition concomitante des PDE4.

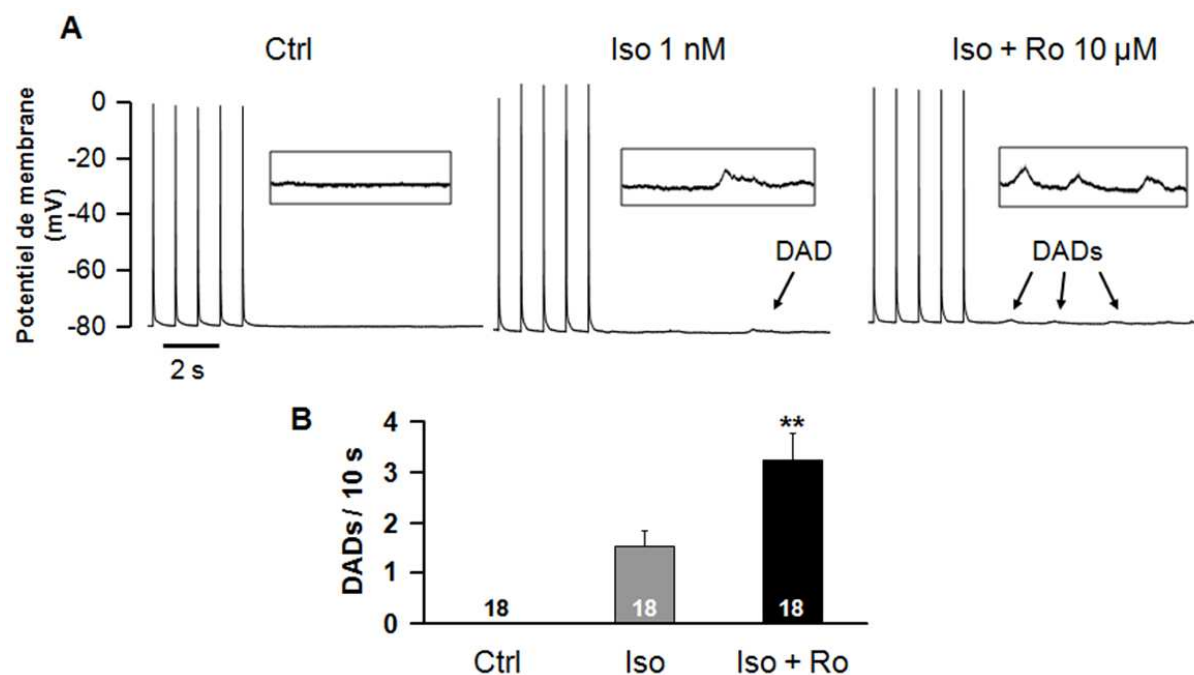


Figure 1 : Effet d'une stimulation β -AR avec ou sans inhibition concomitante des PDE4 sur le potentiel de membrane de cardiomyocytes ventriculaires de rat enregistrés avec la technique de patch clamp en configuration cellule entière.

A : Exemples de tracés obtenus lors de l'enregistrement de potentiels d'action avec apparition de post-dépolarisations tardives (DADs) en conditions Iso et Iso + Ro (encadrés : agrandissement du tracé enregistré pendant la pause de 10 s sans impulsion électrique), **B** : Fréquences moyennes d'apparition de DADs. Le nombre de cellules testées est indiqué dans les barres du graphique.

C. Conclusions

L'inhibition des PDE4 sous stimulation submaximale des récepteurs β -AR par 1 nM d'Iso entraîne des DADs connues pour être liées à des vagues calciques spontanées issues de l'activité des RyR2. Afin de les caractériser, j'ai par la suite mesuré les niveaux de Ca^{2+} intracellulaire et la contraction simultanément grâce à la technique de Ionoptix.

III. Rôle des PDE3 et des PDE4 dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} et la prévention des arythmies chez le rongeur

A. Introduction

Le premier objectif de cette étude a été de déterminer le rôle des PDE4 dans le maintien de l'homéostasie Ca^{2+} . Pour cela, nous avons étudié les effets de l'inhibition des deux familles de PDE ayant précédemment été montrées comme jouant chacune un rôle majeur dans le CEC. Nous avons étudié en premier lieu les PDE4, mais également le rôle des PDE3 qui constituent la famille majeure de PDE impliquée dans la régulation du CEC cardiaque en conditions basales chez le rongeur (Mika et al. 2013) et dont l'inhibition entraîne un risque accru de survenue d'arythmies chez l'Homme (Packer et al. 1991). Nous avons pour cela réalisé une étude des effets d'inhibiteurs des PDE3 et PDE4 sur les transitoires Ca^{2+} , la contraction cellulaire, la charge et la fuite en Ca^{2+} du RS. Le second objectif de cette étude a été de préciser les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu dans ces processus pro-arythmiques. Pour cela, nous avons réalisé une étude des effets des inhibiteurs des PDE3 et PDE4 sur les transitoires Ca^{2+} , la contraction cellulaire, la charge et la fuite en Ca^{2+} du RS en présence d'inhibiteurs de la PKA et de la CaMKII. Ces expériences ont été mises en parallèle avec l'analyse par western blot des degrés de phosphorylation par la PKA et la CaMKII de RyR2 et PLB. Nous avons enfin précisé l'implication des isoformes d'Epac grâce à des inhibiteurs pharmacologiques.

B. Résultats

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article qui suit :

Article 2 :

Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca^{2+} waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors

Bobin P, Varin A, Lefebvre F, Fischmeister R, Vandecasteele G, Leroy J.

**Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca^{2+} waves
induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors**

Pierre Bobin^{1,2}, Audrey Varin^{1,2}, Florence Lefebvre^{1,2}, Rodolphe Fischmeister,^{1,2}

Grégoire Vandecasteele^{1,2}, Jérôme Leroy^{1,2}

¹INSERM UMR-S1180, LabEx LERMIT, DHU TORINO, Châtenay-Malabry, France

²Univ Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

Running title: CaMKII inhibition to prevent ventricular arrhythmias induced by phosphodiesterase inhibition

Correspondence to:

Dr. Jérôme LEROY

INSERM UMR-S1180, LabEx LERMIT, DHU TORINO

Université Paris-Sud

Faculté de Pharmacie

5, Rue J.-B. Clément

F-92296 Châtenay-Malabry Cedex

France

Tel. 33-1-46 83 57 71

Fax 33-1-46 83 54 75

E-mail: jerome.leroy@u-psud.fr

ABSTRACT

Rationale

A major concern of using PDE inhibitors as therapeutic agents in heart failure (HF) is their potential to increase mortality by inducing arrhythmias. By diminishing cAMP hydrolysis, they promote PKA activity under β -adrenergic stimulation (β -AR) thus Ca^{2+} cycling and contraction. However, β -AR/cAMP signalling can activate CaMKII, a factor of arrhythmogenesis, via PKA or the exchange protein factor Epac but the role of PDEs in controlling these pathways remains elusive.

Methods and results

Excitation-contraction coupling was investigated in isolated adult rat ventricular myocytes loaded with Fura-2AM (1 $\mu\text{mol/L}$) paced at 1 Hz allowing coincident measurement of intracellular Ca^{2+} and sarcomere shortening. The PDE4 inhibitor Ro 20-1724 (Ro, 10 $\mu\text{mol/L}$) promotes the inotropic effects of the non selective β -AR agonist Isoprenaline (Iso, 1nmol/L) but also spontaneous diastolic Ca^{2+} waves (SCWs). PDE4 inhibition potentiates RyR2 and PLB phosphorylation at specific PKA and CaMKII sites furthering sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} load and a SR Ca^{2+} leak measured in a $0\text{Na}^+, 0\text{Ca}^{2+}$ solution $\pm 1\text{mmol/L}$ tetracaine. PKA inhibition with H-89 (10 $\mu\text{mol/L}$) suppressed all these effects of Iso \pm Ro while CaMKII inhibition with KN-93 (10 $\mu\text{mol/L}$), prevented SR Ca^{2+} leak and diminished SCWs incidence without affecting the inotropic effects of Ro. Epac2 inhibition with ESi-05 (5 $\mu\text{mol/L}$) but not that of Epac1 diminished by 40 % the occurrence of SCWs. PDE3 inhibition with cilostamide (Cil 1 $\mu\text{mol/L}$) induced a SR Ca^{2+} leak which was also blocked by KN-93.

Conclusions

Our results show that PDE inhibitors exert inotropic effects via PKA but lead to SCWs via both PKA and CaMKII activation partly via Epac2 suggesting the potential use of CaMKII inhibitors as adjuncts to PDE inhibition to limit their pro-arrhythmic effects.

Key Words: cAMP ■ 5'-3' cyclic nucleotide phosphodiesterases ■ β -adrenergic receptors ■ Arrhythmia ■ CaMKII

INTRODUCTION:

Upon stress or during exercise, norepinephrine released by the sympathetic nerve terminals activates the β -adrenergic receptors (β -ARs) to elicit positive inotropic, chronotropic and lusitropic effects. β -ARs couple primarily to $G_{\alpha s}$ proteins, leading to stimulation of adenylyl cyclases (AC) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production. In turn, cAMP activates the cAMP-dependent protein kinase (PKA) which phosphorylates key proteins of the cardiac excitation-contraction coupling (ECC) process, including the sarcolemmal L-type Ca^{2+} channels (LTCC), the ryanodine receptors (RyR2) of the sarcoplasmic reticulum (SR) and phospholamban (PLB), a constitutive inhibitor of the SR Ca^{2+} pump, SERCA2. As a result of PKA phosphorylation, Ca^{2+} entry through the sarcolemma is increased, as well as Ca^{2+} release and replenishment from the SR, leading to enhanced Ca^{2+} cycling and consequently to inotropic and lusitropic effects.¹ A tight control of Ca^{2+} homeostasis is essential since perturbations such as diastolic SR Ca^{2+} leak via RyR2 increases occurrence of spontaneous Ca^{2+} waves (SCWs) leading to electrogenic sodium- Ca^{2+} exchanger currents, thus delayed after depolarisations able to trigger action potentials when the threshold for Na^+ channel activation is reached.² Alongside PKA, the Ca^{2+} /Calmodulin-dependant kinase II (CaMKII) has been identified over the past years as a contributor to β -AR regulation of cardiac function.³ Indeed, LTCC, RyR2 and PLB are also substrates for CaMKII which contributes to the inotropic and lusitropic effects of β -AR agonists. This appears especially true upon the excessive β -AR activation occurring under pathological conditions, notably in heart failure (HF), where chronic β -AR stimulation is accompanied with perturbations of the cAMP signaling pathway⁴ and increased CaMKII activity.⁵ Interestingly, CaMKII has been identified as the main suspect to provoke the Ca^{2+} handling disturbances observed upon excessive β -AR stimulation in physiological conditions and in HF.⁶⁻⁸ Thereafter, Epac (exchange protein directly activated by cAMP), a direct target of cAMP, has emerged as a link between β -AR/cAMP signaling and CaMKII activation to promote, independently of PKA, a pro-arrhythmogenic SR Ca^{2+} leak.⁹⁻¹¹

The cAMP concentration in cells is orderly regulated not only by its synthesis but also through its degradation by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs).¹² Among the eleven PDE families identified in mammals, PDE3 and PDE4 represent 70% to 90% of the total activity degrading cAMP in heart¹³⁻¹⁵ Given that PDE3 dominates in human heart¹⁶ and β -AR are desensitized in heart failure (HF),⁴ PDE3 inhibitors were identified as useful inotropes to boost the failing pump¹⁷ and to prevent post-operative low cardiac output syndrome after cardiac surgery.¹⁸ Mechanistically, PDE3 inhibitors enhance either the basal or the pre-stimulated Ca^{2+} current (depending on species and/or cardiac territory), and Ca^{2+} reuptake by the SR^{16,19}. Nonetheless, their use is now limited to advance disease states, mainly acute

HF, since chronic treatment with these agents has been incriminated in arrhythmias hence augmented mortality of treated patients.^{18, 20} PDE4 is overriding in rodent cardiomyocytes to control ECC especially upon β -AR stimulation,¹³ but also contributes to cAMP degradation in larger species as shown in dogs²¹ and human cardiomyocytes.²² The pharmacological inhibition of PDE4 was shown to enhance the pro-arrhythmic effect of β -AR stimulation in mouse ventricular²³ and human atrial strips²². In mice, genetic ablation of the *Pde4b* gene or of the *Pde4d* gene enhances the susceptibility to stress-induced ventricular tachycardia.^{24,25} These phenotypes were associated with exacerbated β -AR stimulation of Ca^{2+} influx in *Pde4b*-deficient mice²⁴ and PKA-dependent hyperphosphorylation of RyR2 in *Pde4d*-deficient mice²⁵. In the latter, hyperphosphorylation of PLB was also reported.^{24,26} Thus, while the contribution of PDEs to confine PKA activity in cardiac cells is well documented, no study reported the implication of CaMKII in the arrhythmias evoked by PDE inhibitors. Recently, a signalosome including β -AR/Epac/CaMKII organized around the scaffold protein β -Arrestin was found to include a PDE4 isoform²⁷, suggesting that PDE4 may control this pro-arrhythmic signaling pathway. A link between PDE4 and CaMKII is also suggested by the recent finding that CaMKII can phosphorylate and activate PDE4 activity in cardiomyocytes.²⁸ Collectively, these studies suggest intricate entanglement of the cAMP/PKA and cAMP/Epac/CaMKII pathways both under PDE4 control. Particularly, they suggest that Ca^{2+} handling deregulations observed upon PDE inhibition may involve CaMKII activation via the classical cAMP/PKA pathway and/or Epac. This prompted us to delineate in more details the cellular mechanisms responsible for the pro-arrhythmic effects of PDE4 and PDE3 inhibitors and to elucidate the underlying signaling pathways of these Ca^{2+} disturbances.

METHODS

An expanded methods section is provided in the online Data Supplement.

All experiments were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (2010/63/UE, 22 september 2010), the local Ethics Committee (CREEA Ile-de-France Sud) guidelines and the French decree n° 2013-118, 1st February 2013 on the protection of animals used for scientific purposes (JORF n°0032, 7 February 2013 p2199, text n° 24). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the Ministère français de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (agreement N°B 92-019-01).

ARVMs were obtained using retrograde Langendorff perfusion and 1 mg/mL of collagenase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) (37 °C). An IonOptix system was used

to record simultaneously intracellular Ca^{2+} and sarcomere shortening in ARVMs loaded with 1 μM Fura-2AM and paced at 1Hz, as previously described.²⁹ Cell extracts were used to perform western blot analysis using specific rabbit polyclonal antibodies from Badrilla against phosphorylated PLB at Ser16 and Thr17 and RyR2 at Ser2808 and Ser2814. Specific mouse polyclonal antibodies from Cell Signaling Technology against total RyR2 and specific mouse polyclonal antibodies against β -actin from Santa Cruz were used as a loading control.

RESULTS

PDE4 inhibition potentiates the inotropic effects of β -AR stimulation but promotes spontaneous Ca^{2+} waves in ARVMs

To investigate the role of PDE4 in controlling the ECC and the pro-arrhythmic effects of its inhibition, Ca^{2+} transients (CaT) and sarcomere shortening (SS) were simultaneously recorded in ARVMs loaded with 1 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2-AM and paced at 1 Hz (Fig. 1A). Under control conditions (Ctrl), average diastolic sarcomere length was 1.75 ± 0.01 $\mu\text{mol/L}$. Mean CaT amplitude was 38.9 ± 4.0 % above basal Fura-2 ratio and SS was 2.1 ± 0.6 %. CaT and SS declined to diastolic levels with time constants (τ) estimated at 0.33 ± 0.02 s and 0.29 ± 0.03 s, respectively (Fig. 1B, 1C). While PDE4 inhibition with Ro 20-1724 (Ro, 10 $\mu\text{mol/L}$) affected neither the basal amplitude of CaT nor SS, it accelerated the relaxation kinetics of both Ca^{2+} and shortening twitches to 0.26 ± 0.02 s and 0.17 ± 0.02 s respectively ($p < 0.05$ vs. ctrl, Fig. 1C). β -AR stimulation by isoproterenol (Iso, 1 nmol/L) increased the amplitude of CaT and SS by ~ 3 -fold% and ~ 6 -fold respectively ($p < 0.001$ vs. Ctrl, Fig 1B). Iso also strongly accelerated the relaxation rates of both parameters by 54.5 ± 6.1 % and 86.2 ± 1.4 % ($p < 0.001$ vs. Ctrl, Fig. 1C). These inotropic and lusitropic effects were potentiated by PDE4 inhibition: CaT was further increased by 19.5 ± 4.3 % and SS by 39.7 ± 4.8 % in Iso+Ro ($p < 0.001$ vs. Iso, Fig. 1B). Decay time constants also tended to decrease but this did not reach statistical significance in comparison with Iso alone (Fig. 1C). When PDE4 was inhibited in the absence of β -AR agonist, diastolic Fura-2 ratio remained unchanged and none of the cells exhibited SCWs upon cessation of stimulation (Fig 1D). When cells were subjected to Iso, only sparse SCWs could be observed (0.4 ± 0.3 per 10 s) in $\sim 20\%$ of the cells. However, when Ro was applied in combination with Iso, a $14.7 \pm 1.2\%$ elevation of diastolic Fura-2 ratio was observed ($p < 0.001$ vs. Iso) and all cells exhibited pro-arrhythmogenic SCWs at a frequency of 2.3 ± 0.2 per 10 s ($p < 0.001$ vs. Iso, Fig 1D).

PDE4 inhibition upon β -AR stimulation leads to diastolic SR Ca^{2+} leak

To further delineate the cellular mechanisms underlying the SCWs evoked by PDE4 inhibition upon β -AR stimulation, we measured the SR Ca^{2+} leak using a $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ solution to prevent Ca^{2+} extrusion by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, and tetracaine to block RyR2s. A rapid application of 10 mmol/L caffeine was applied at the end of the experiment to evaluate SR Ca^{2+} load (Fig. 2). While negligible in basal conditions, a SR Ca^{2+} leak appeared upon β -AR stimulation with 1 nmol/L Iso ($p < 0.05$ vs. Ctrl) which correlated with an increased SR Ca^{2+} load ($+33 \pm 5.6\%$, $p < 0.001$ vs. Ctrl, Fig. 2A, B, C). Interestingly, additional PDE4 inhibition

drastically increased SR Ca^{2+} leak ($+147.6 \pm 33.3$ %, $p < 0.001$ vs. Iso, Fig. 2B), while modestly increasing SR Ca^{2+} load ($+20.6 \pm 7.8$ %, $p < 0.05$ vs. Iso, Fig. 2C). Fractional release (the ratio of Ca^{2+} released during a twitch divided by SR Ca^{2+} load) was increased from 52% in Ctrl to 62% in Iso ($p < 0.05$ vs. Ctrl) and up to 72% in Iso+Ro ($p < 0.05$ vs. Iso, Fig. 2D).

PDE4 inhibition promotes RyR2 and PLB phosphorylation at PKA and CaMKII specific sites

Because RyR2 and PLB are major determinants of SR Ca^{2+} load and leak, we examined the phosphorylation levels of these proteins by western blot (Figure 3). When cells were challenged with Iso (1 nmol/L) alone, an increase in the phosphorylation of RyR2 at Ser2808 and PLB at Ser16 (PKA sites) was observed, which became significant with concomitant PDE4 inhibition (Fig. 3A, C). Similarly, phosphorylation of both RyR2 at Ser2814 and PLB at Thr17 (CaMKII sites) became significant only when cells were stimulated with a combination of Iso+Ro (Fig. 3B and 3D).

Respective role of PKA and CaMKII in the dysregulation of Ca^{2+} homeostasis induced by PDE4 inhibition

We next evaluated the relative contribution of PKA and CaMKII in the pro-arrhythmogenic effects of Iso+Ro. For this, cells were first pre-incubated for 10 minutes prior the experiment and throughout data acquisition in a ringer solution containing the PKA inhibitor H-89 at 10 $\mu\text{mol/L}$. This concentration was chosen as it abolishes >80% of the kinase activity induced by Iso+Ro in ARVMs, whereas 1 $\mu\text{mol/L}$ had minor effects as determined by fluorescence resonance energy transfer using the PKA reporter AKAR3³⁰ (Supplemental Fig. S1). Under basal conditions, H89 did not affect the mean CaT amplitude but slowed the return to diastolic Ca^{2+} levels ($p < 0.05$ vs. Ctrl) without significantly affecting SS (Fig. 4B, C). H-89 abolished the increase in both CaT and SS induced by β -AR stimulation alone or with concomitant PDE4 inhibition (Fig. 4A, B, $p < 0.001$ vs. without inhibitor). The lusitropic effects of Iso+Ro were also suppressed in these conditions (Fig. 4C, $p < 0.001$ vs. without inhibitor). The increase in diastolic Ca^{2+} levels observed in Iso+Ro was blunted by PKA inhibition and none of the cells exhibited SCWs (Fig. 4D, $p < 0.001$ vs. Ctrl). Importantly, adenoviral transduction of ARVMs with PKI, a highly specific inhibitory peptide of PKA³¹, did not modify basal CaT and SS compared to control ARVMs transduced with an adenovirus encoding β -Gal, but abolished the inotropic and lusitropic effects of Iso+Ro, as well as the diastolic Ca^{2+} overload and the occurrence SCWs ($p < 0.001$ vs. β -Gal, Supplemental Fig. S2).

In order to test the contribution of CaMKII, the effects of Iso and Iso+Ro were analysed in cells pre-incubated for 10 minutes with either 10 $\mu\text{mol/L}$ of the CaMKII inhibitor, KN-93 or 10

$\mu\text{mol/L}$ of its inactive analogue, KN-92 (Fig. 5). In the presence of KN-93, Iso increased CaT amplitude by $113.8 \pm 37.5\%$ and SS by $392.6 \pm 113.1\%$, similarly to what was recorded in cells pre-incubated with KN-92. PDE4 inhibition potentiated the effect of Iso on CaT amplitude and SS, which were additionally increased by $87.7 \pm 23.5\%$ and $91.3 \pm 7.0\%$ respectively upon Iso+Ro ($p < 0.001$ vs. Iso, Fig. 5B). Decay time of Ca^{2+} and contraction twitches were similarly decreased by Iso and further accelerated by Ro in cells pre-incubated with KN-93 or KN-92 (Fig. 5C). Interestingly, whereas KN-93 did not prevent the inotropic and lusitropic effects of the PDE4 inhibitor, it reduced the number of arrhythmic cells by 50% and SCWs occurrence by $71.6 \pm 12.0\%$, (Fig. 5D, $p < 0.05$ vs. KN-92). KN-93 also prevented the increase in diastolic Ca^{2+} levels observed in cells pre-incubated with KN-92 ($p < 0.05$ vs Ctrl, Fig. 5D). Decisively, pre-incubation of the cardiomyocytes with 100 nmol/L of the Autocamtide-2-Related Inhibitory Peptide (AIP), a highly potent and specific substrate competitive inhibitor of CaMKII, recapitulated the inhibitory effects of KN-93 on the pro-arrhythmogenic Ca^{2+} events (Supplemental Fig. S3). The relative contribution of PKA and CaMKII to the setting of the SR Ca^{2+} leak and the increase of the SR Ca^{2+} load promoted by PDE4 inhibition was then assessed using the same protocol as described in Fig. 2. As shown in Fig. 6, H-89 abolished the SR Ca^{2+} leak and decreased the SR Ca^{2+} load measured upon Iso+Ro by $47.1 \pm 3.0\%$ ($p < 0.001$, Fig. 6B, C). Fractional release was drastically diminished by PKA inhibition from $69 \pm 3\%$ in Iso+Ro alone to $37 \pm 2\%$ in the presence of H-89 ($p < 0.001$, Fig. 6D). Similarly to H89, CaMKII inhibition with KN-93 dramatically reduced the SR Ca^{2+} leak by $85.4 \pm 10.1\%$, ($p < 0.001$ vs. KN-92, Fig. 6B), however SR Ca^{2+} load was slightly increased in KN-93, and consequently fractional Ca^{2+} release was decreased (Fig. 6D, $p < 0.01$ vs. KN-92).

The exchange protein directly activated by cAMP Epac2 participates to the arrhythmias induced by PDE4 inhibition

To precise the signalling pathway leading to CaMKII activation upon PDE4 inhibition, we pre-incubated the cardiomyocytes with either 10 $\mu\text{mol/L}$ CE3F4 to inhibit Epac 1³² or 5 $\mu\text{mol/L}$ ESI-05 to inhibit Epac 2³³ (Fig. 6 A). None of the two Epac inhibitors affected the amplitude of CaT or SS in the different experimental conditions (Fig. 7B and 7C). Nonetheless, while SCWs occurrence was not impacted by Epac1 inhibition, ESI-05 diminished SCWs occurrence in Iso+Ro by $41.2 \pm 8.8\%$ (Fig. 7D, $p < 0.05$ vs vehicle).

CaMKII inhibition prevents the SR Ca^{2+} leak promoted by PDE3 inhibition upon β -AR stimulation

The above results clearly identify CaMKII as a mediator of the pro-arrhythmic effects elicited by PDE4 inhibition. In order to know whether this mechanism is specific to PDE4, we studied the effects of PDE3 inhibition on Ca^{2+} homeostasis (Fig. 8). As expected, PDE3 inhibition

with cilostamide (Cil, 1 $\mu\text{mol/L}$) enhanced the positive inotropic effects of Iso (data not shown). Cil potentiated SR Ca^{2+} leak by $52.8 \pm 15.7\%$ (Fig. 8B, $p < 0.05$ vs. Iso) and SR Ca^{2+} load by $23.0 \pm 6.8\%$ (Fig. 7B, $p < 0.05$ vs. Iso) and significantly promoted fractional release (Fig. 7B, $p < 0.01$ vs. Iso). To assess whether CaMKII inhibition prevents the arrhythmogenic SR Ca^{2+} leak induced by Iso+Cil, cells were pre-incubated with KN-93 or KN-92. CaMKII inhibition did not modify the stimulatory effect of Iso+Cil on CaT amplitude and SS (Fig. 8C), but largely prevented SR Ca^{2+} leak (Fig. 8D, $p < 0.001$ vs. KN-92), slightly increased the SR Ca^{2+} load and these effects were accompanied with decreased fractional release (Fig. 8D, $p < 0.001$ vs. KN-92).

DISCUSSION

PDE3 and PDE4 are the main phosphodiesterase families degrading cAMP generated upon β -AR stimulation in the heart. Cardiotonic drugs such as milrinone target these enzymes and more specifically the PDE3 family to improve cardiac output in HF or after surgery for congenital cardiac diseases.¹⁸ By elevating cAMP, these treatments have beneficial hemodynamic actions but promote sudden cardiac death due to arrhythmias which seriously compromise their use^{18, 20, 34} PDE4 downregulation also enhances ECC and abnormal pro-arrhythmic spontaneous Ca^{2+} release events.^{22, 24, 25} The present study provides new insights into the underlying cellular mechanisms of these electrophysiological perturbations associated to the use of PDE inhibitors. We show that upon β -AR stimulation, the positive inotropic effects of PDE4 inhibition is accompanied by increased SR Ca^{2+} load and leak, leading to elevated diastolic Ca^{2+} levels and increased occurrence of spontaneous Ca^{2+} waves. We demonstrate that PDE4 inhibition exerts positive inotropic effects via PKA but induces a pro-arrhythmogenic SR Ca^{2+} leak via both PKA and CaMKII, the latter being activated via the classical cAMP/PKA pathway and to some extent via Epac2. Finally, we show that CaMKII inhibition can also prevent the SR Ca^{2+} leak promoted by PDE3 inhibitors. Thus, our results show that inhibiting CaMKII could prevent the pro-arrhythmic effects of PDE inhibitors while preserving their beneficial inotropic effects.

PDE3 or PDE4 inhibition promote the inotropic effects of a non-maximal β -AR stimulation by increasing PKA phosphorylation of LTCC, RyR2, PLB and contractile proteins.²⁹ The increase in CaT amplitude is consistent with an enhanced Ca^{2+} entry *via* the LTCC³⁵ and the increased SR Ca^{2+} load.³⁶ PLB phosphorylation by PKA at Ser16, which is essential for β -AR stimulation of ECC³⁷, is potentiated by PDE4 inhibition (as shown in this study) as well as by PDE3 inhibition.²⁹ PKA phosphorylation of RyR2 at Ser2808, even though controversial³⁸ has been shown to promote its sensitivity to Ca^{2+} .³⁹ Altogether, these mechanisms can explain the increased SR Ca^{2+} load and fractional release observed upon PDE4 and PDE3 inhibition. Accordingly, H-89 at 10 $\mu\text{mol/L}$, the concentration required to inhibit most of PKA activity in ARVMs in our experimental conditions (supplemental Figure S1), prevented all the inotropic and lusitropic effects of PDE4 inhibition. However, H89 at this concentration can also inhibit SERCA activity.⁴⁰ This could explain the slower relaxation of CaT observed in H-89 and by limiting the SR Ca^{2+} load, could have precluded the PKA-independent stimulatory effects of Epac on ECC reported earlier.¹¹ Nonetheless, overexpression of PKI, a more specific PKA inhibitor but equally effective to inhibit the kinase in cardiomyocytes,³⁰ abolished the inotropic and lusitropic effects of the β -AR stimulation with or without concomitant PDE4 inhibition

(supplemental Figure S2). These results and the lack of effect of Epac and CaMKII inhibitors on CaT amplitude and shortening shown in Fig. 5 and 7 further demonstrate that PKA is responsible for the cardiotonic effects of PDE4 inhibition, in accordance with the preserved β -AR stimulation of ECC observed in mice invalidated for Epac¹⁰ or CaMKII.⁴¹ Upon sub-maximal β -AR stimulation, PDE4 inhibition increases diastolic Ca^{2+} levels and SCW occurrence, suggesting SR Ca^{2+} leak via RyR2. This was corroborated by the acute block of RyR2 with tetracaine resulting in increased shift of Ca^{2+} back to the SR.⁸ It is known that upon β -AR stimulation, not only PKA but also CaMKII is activated to promote SR Ca^{2+} leak.³ Alongside PKA and in agreement with a recent report,²⁸ CaMKII is also activated upon PDE4 inhibition as demonstrated by PLB and RyR2 phosphorylation on Thr17 and Ser2814, respectively (Figure 3). Inhibition of PKA abolishes the increase in diastolic Ca^{2+} levels, the SR Ca^{2+} leak and SCWs, demonstrating that PKA is the initial trigger for the pro-arrhythmic effects of the PDE4 inhibitor. Interestingly, CaMKII inhibition diminished the number of cells exhibiting SCWs and drastically blunted the SR Ca^{2+} leak. Furthermore, the increase in fractional release induced by Iso and concomitant PDE4 inhibition is abolished by H-89 and decreased by KN-93, suggesting that both kinases participate in the Ca^{2+} sensitization of RyR2. Whether PKA phosphorylation of RyR2 participates, remains controversial^{38, 42} and cannot be ruled out from our experiments. Nonetheless, because PDE3 or PDE4 inhibition increase SR Ca^{2+} load via PKA phosphorylation of PLB, this could by itself explain the RyR2 sensitization to Ca^{2+} , given that luminal Ca^{2+} determines RyR2 open probability.⁴³ Furthermore, promoted SERCA activity will enable sufficient SR Ca^{2+} refilling to counterbalance the SR Ca^{2+} leak and maintain luminal Ca^{2+} levels close to the threshold necessary to generate Ca^{2+} waves as previously demonstrated.⁴⁴ CaMKII inhibition limits SR Ca^{2+} leak upon β -AR stimulation and concomitant PDE4 inhibition without affecting the SR Ca^{2+} content. This could be explained by increased Ca^{2+} sensitivity of RyR2 due to the increased phosphorylation at Ser2814⁴⁵ as we observed in these conditions, while PKA phosphorylation of PLB at Ser16 rather than by CaMKII at Thr17 would be sufficient to promote SERCA activity as previously demonstrated.³⁷

The elevated cytosolic Ca^{2+} due to PKA appears as the main contributor to CaMKII activation. Nonetheless, the diminished occurrence of SCWs when cells were pre-incubated with ESI-05, suggests a role for Epac2 upon PDE4 inhibition. This result is in line with diminished Ca^{2+} sparks observed upon β -AR stimulation in Epac2 Knock-out mice¹⁰ and suggests that PDE4 regulates Epac2 to limit CaMKII activation as recently suggested²⁸. Of note, ESI-05 partially diminished the occurrence of SCWs in Iso+Ro but not the few events observed upon non maximal β -AR stimulation alone. This could be explained by the higher cAMP levels required for Epac activation compared to PKA activation.⁴⁶ Whether activation of

Epac2 is under the control of PDE3 remains to be determined. Nonetheless, CaMKII inhibition could prevent the increased SR Ca^{2+} leak induced by cilostamide, demonstrating that this kinase participates to the arrhythmias evoked by PDE3 inhibitors.

To conclude, our work provides new insights into the cellular mechanisms underlying the arrhythmias observed upon PDE3 and PDE4 inhibition. It unveils that PDE3 and PDE4 inhibitors exert inotropic effects via PKA by increasing SR Ca^{2+} load but promote diastolic pro-arrhythmic Ca^{2+} waves linked to a SR Ca^{2+} leak via both PKA and CaMKII. Interestingly, CaMKII inhibition does not alter the inotropic effects of these PDE inhibitors. Indeed, all our results may not be transposable to a pathological state, especially in heart failure where the β -AR/cAMP pathway is altered⁴. Nonetheless, in the context of acute and decompensated HF where Epac⁴⁷ and CaMKII⁵ are upregulated, PDE inhibitors have proven beneficial on hemodynamics. Interestingly, CaMKII inhibition can prevent apoptosis⁴⁸ another adverse consequence of PDE inhibition.^{20,49} This suggests the potential use of CaMKII inhibitors in adjunct to PDE inhibitors to counteract their side effects while preserving their inotropic properties.

Acknowledgements

The authors wish to Patrick Lechène for technical support for acquisition and analysis of the data.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by the Fondation de France (to GV), the Agence Nationale de la Recherche 2010 BLAN 1139-01 (to GV). PB was a recipient of doctoral grants from the CORDDIM program of Région Ile-de-France and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

1. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205
2. Venetucci LA, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA. The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovascular research*. 2008;77:285-292
3. Grimm M, Brown JH. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48:322-330

4. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? *Circulation research*. 2003;93:896-906
5. Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;51:468-473
6. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circulation research*. 2005;97:1314-1322
7. Curran J, Brown KH, Santiago DJ, Pogwizd S, Bers DM, Shannon TR. Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;49:25-32
8. Curran J, Hinton MJ, Rios E, Bers DM, Shannon TR. β -adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circulation research*. 2007;100:391-398
9. Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Bénitah J-P, Lezoualc'h F, Gómez AM. The cAMP binding protein Epac modulates Ca^{2+} sparks by Ca^{2+} /calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *The Journal of physiology*. 2007;583:685-694
10. Pereira L, Cheng H, Lao DH, Na L, van Oort RJ, Brown JH, Wehrens XH, Chen J, Bers DM. Epac2 mediates cardiac beta1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and arrhythmia. *Circulation*. 2013;127:913-922
11. Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. Epac-mediated activation of phospholipase C ϵ plays a critical role in β -adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca^{2+} mobilization in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:5488-5495
12. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52:323-329
13. Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechêne P, Mazet J-L, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Spatiotemporal dynamics of β -adrenergic cAMP signals and L-type Ca^{2+} channel regulation in adult rat ventricular myocytes: Role of phosphodiesterases. *Circulation research*. 2008;102:1091-1100
14. Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet J-L, Cooper DMF, Fischmeister R. Negative feedback exerted by PKA and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes. An *in vivo* study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:52095-52105
15. Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circulation research*. 2004;95:65-75
16. Osadchii OE. Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007;21:171-194
17. Movsesian M, Stehlik J, Vandeput F, Bristow MR. Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Heart failure reviews*. 2009;14:255-263

18. Smith AH, Owen J, Borgman KY, Fish FA, Kannankeril PJ. Relation of milrinone after surgery for congenital heart disease to significant postoperative tachyarrhythmias. *The American journal of cardiology*. 2011;108:1620-1624
19. Beca S, Ahmad F, Shen W, Liu J, Makary S, Polidovitch N, Sun J, Hockman S, Chung YW, Movsesian M, Murphy E, Manganiello V, Backx PH. Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2A signaling complexes in mouse heart. *Circulation research*. 2013;112:289-297
20. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *The New England journal of medicine*. 1991;325:1468-1475
21. Molina CE, Johnson DM, Mehel H, Spatjens RL, Mika D, Algalarrondo V, Slimane ZH, Lechene P, Abi-Gerges N, van der Linde HJ, Leroy J, Volders PG, Fischmeister R, Vandecasteele G. Interventricular differences in beta-adrenergic responses in the canine heart: role of phosphodiesterases. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3:e000858
22. Molina CE, Leroy J, Richter W, Xie M, Scheitrum C, Lee IO, Maack C, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Verde I, Llach A, Hove-Madsen L, Conti M, Vandecasteele G, Fischmeister R. Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59:2182-2190
23. Galindo-Tovar A, Kaumann AJ. Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac β_1 -adrenoceptors. *British journal of pharmacology*. 2008;153:710-720
24. Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LRV, Abi-Gerges A, Xie M, Scheitrum C, Lefebvre F, Schittl J, Westenbroek R, Catterall WA, Charpentier F, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca^{2+} channel complex regulates Ca^{2+} current and protects against ventricular arrhythmias. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:2651-2661
25. Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SLC, Conti M, Marks A. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*. 2005;123:23-35
26. Beca S, Helli PB, Simpson JA, Zhao D, Farman GP, Jones P, Tian X, Wilson LS, Ahmad F, Chen SR, Movsesian MA, Manganiello V, Maurice DH, Conti M, Backx PH. Phosphodiesterase 4D Regulates Baseline Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release and Cardiac Contractility, Independently of L-Type Ca^{2+} Current. *Circulation research*. 2011
27. Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Sauliere A, Sin YY, Laurent AC, Gales C, Baillie G, Lezoualc'h F. Specific interactions between Epac1, beta-arrestin2 and PDE4D5 regulate beta-adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cellular signalling*. 2013;25:970-980
28. Mika D, Richter W, Conti M. A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112:2023-2028
29. Mika D, Bobin P, Pomerance M, Lechene P, Westenbroek RE, Catterall WA, Vandecasteele G, Leroy J, Fischmeister R. Differential regulation of cardiac

- excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovascular research*. 2013;100:336-346
30. Haj Slimane Z, Bedioune I, Lechene P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, Domergue-Dupont V, Dewenter M, Richter W, Conti M, El-Armouche A, Zhang J, Fischmeister R, Vandecasteele G. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovascular research*. 2014;102:97-106
 31. Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, RayChaudhury A, Green RD. Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol*. 1999;277:C580-C588
 32. Courilleau D, Bissierier M, Jullian JC, Lucas A, Bouyssou P, Fischmeister R, Blondeau JP, Lezoualc'h F. Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287:44192-44202
 33. Chen H, Tsalkova T, Chepurny OG, Mei FC, Holz GG, Cheng X, Zhou J. Identification and characterization of small molecules as potent and specific EPAC2 antagonists. *J Med Chem*. 2013;56:952-962
 34. Cohn JN, Goldstein SO, Greenberg BH, Lorell BH, Bourge RC, Jaski BE, Gottlieb SO, McGrew F, DeMets DL, White BG. A dose-dependent increase in mortality with vesnarinone among patients with severe heart failure. Vesnarinone Trial Investigators. *The New England journal of medicine*. 1998;339:1810-1816
 35. Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *British journal of pharmacology*. 1999;127:65-74
 36. Ginsburg KS, Bers DM. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger. *The Journal of physiology*. 2004;556:463-480
 37. Chu GX, Lester JW, Young KB, Luo WS, Zhai J, Kranias EG. A single site (Ser¹⁶) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to α -agonists. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:38938-38943
 38. Houser SR. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: protein kinase A-mediated hyperphosphorylation of the ryanodine receptor at serine 2808 does not alter cardiac contractility or cause heart failure and arrhythmias. *Circulation research*. 2014;114:1320-1327
 39. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (Ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101:365-376
 40. Hussain M, Drago GA, Bhogal M, Colyer J, Orchard CH. Effects of the protein kinase A inhibitor H-89 on Ca^{2+} regulation in isolated ferret ventricular myocytes. *Pflügers Arch*. 1999;437:529-537
 41. Neef S, Sag CM, Daut M, Baumer H, Grefe C, El-Armouche A, DeSantiago J, Pereira L, Bers DM, Backs J, Maier LS. While systolic cardiomyocyte function is preserved, diastolic myocyte function and recovery from acidosis are impaired in CaMKII δ -KO mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;59:107-116

42. Dobrev D, Wehrens XH. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. *Circulation research*. 2014;114:1311-1319; discussion 1319
43. Lukyanenko V, Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Györke S. Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content and release by luminal Ca^{2+} -sensitive leak in rat ventricular myocytes. *Biophysical journal*. 2001;81:785-798
44. Venetucci LA, Trafford AW, Eisner DA. Increasing ryanodine receptor open probability alone does not produce arrhythmogenic calcium waves: threshold sarcoplasmic reticulum calcium content is required. *Circulation research*. 2007;100:105-111
45. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation research*. 2004;94:e61-70
46. Rehmann H, Prakash B, Wolf E, Rueppel A, De Rooij J, Bos JL, Wittinghofer A. Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat Struct Biol*. 2003;10:26-32
47. Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel J-L, Heymes C, Morel E, Lezoualc'h F. Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates β -adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research*. 2008;102:959-965
48. Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111:617-625
49. Yan C, Miller CL, Abe J. Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circulation research*. 2007;100:489-501

FIGURES

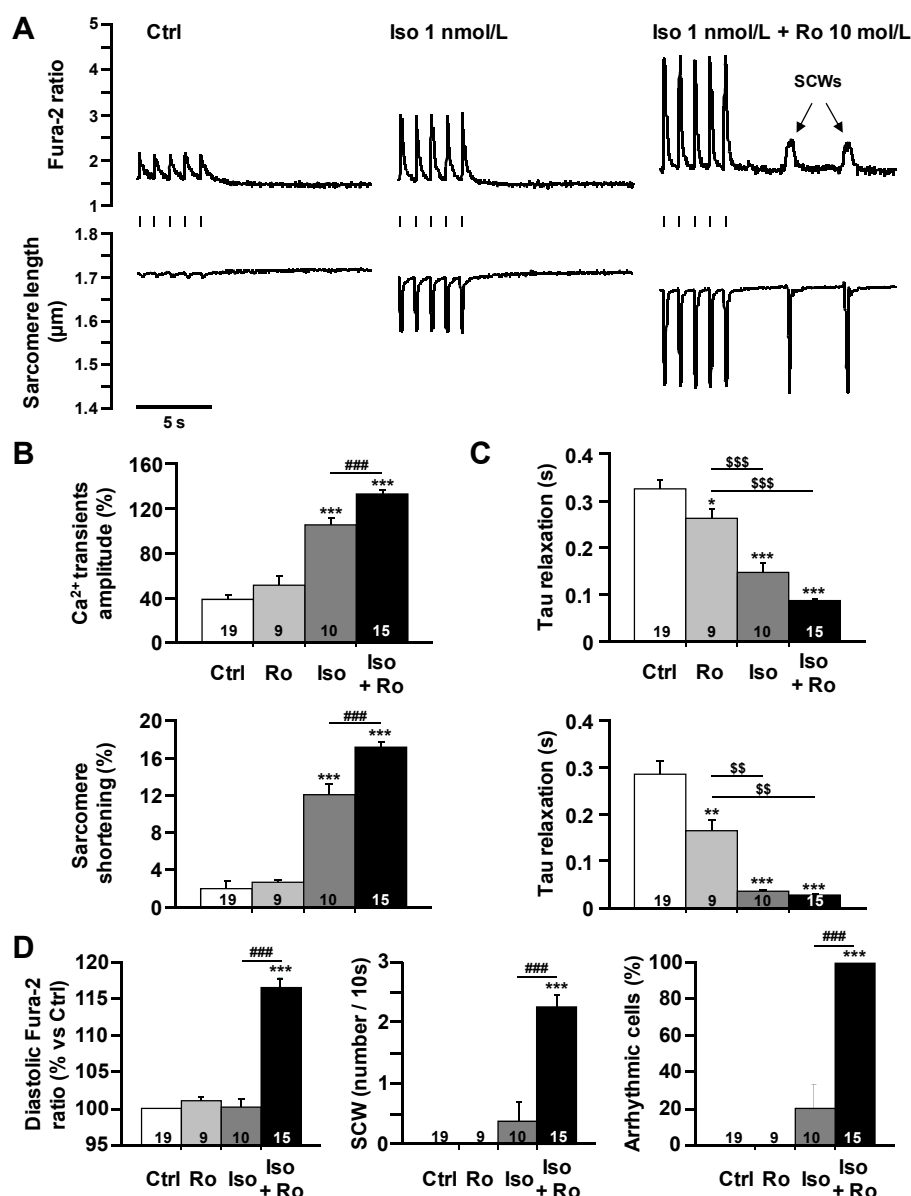


Figure 1: Effect of PDE4 inhibition on ECC and SCWs in ARVMs. (A) Representative traces of Ca²⁺ transients and sarcomere shortening in Fura-2 loaded ARVMs paced at 1 Hz. The occurrence of spontaneous Ca²⁺ waves (SCWs) was evaluated during a 10 s pause in pacing. This protocol was repeated in basal conditions (Ctrl), upon β -AR stimulation by isoproterenol (Iso, 1 nmol/L) alone or with concomitant PDE4 inhibition by Ro 20-1724 (Iso 1 nmol/L + Ro 10 μ mol/L). (B) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca²⁺ transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl (white bar), Ro (light gray bar), Iso (dark gray bar), and Iso+Ro (black bar). (C) Average relaxation kinetics (\pm SEM) of Ca²⁺ transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl, Ro, Iso and Iso+Ro. (D) Percent variation of diastolic Fura-2 ratio (\pm SEM), average number of SCWs (\pm SEM) and proportion of arrhythmic cells under Ctrl, Ro, Iso and Iso+Ro. Number of cells is indicated inside each bar representing the mean of 3 to 4 independent experiments. Statistical significance is indicated as: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (vs Ctrl); \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$ (Ro vs Iso \pm Ro); ####, $p < 0.001$ (Iso vs Iso+Ro). ANOVA followed by a Tukey post hoc test was used to analyse Ca²⁺ transients, sarcomere amplitude and diastolic Fura-2 ratio. ANOVA followed by a Dunn post hoc test was used to analyse the occurrence of SCWs, and χ^2 test followed by a Fischer exact test to compare the percent of arrhythmic cells.

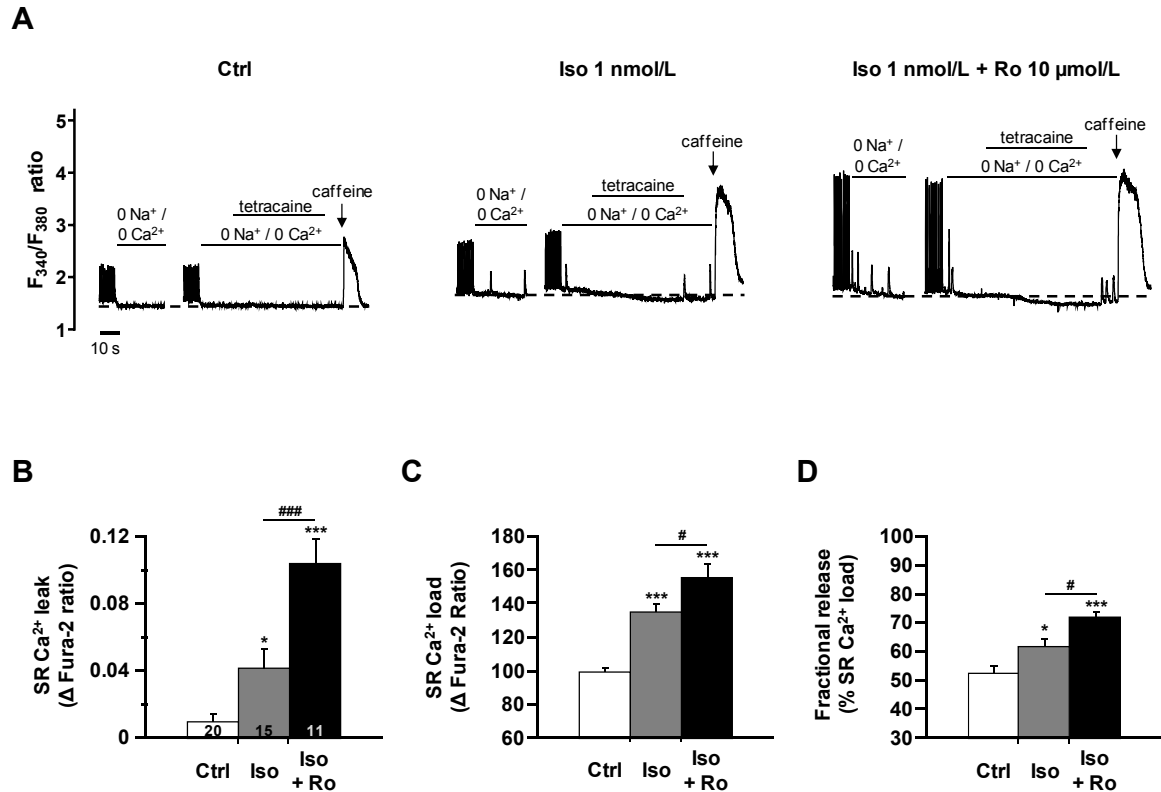


Figure 2: PDE4 inhibition potentiates the effect of sub maximal β -AR stimulation on SR Ca²⁺ leak and load in ARVMs. (A) Representative traces of Ca²⁺ transients, SR Ca²⁺ leak and load measurements in Fura-2 loaded ARVMs under basal conditions (Ctrl), upon β -AR stimulation by isoproterenol (Iso, 1 nmol/L) alone or with concomitant PDE4 inhibition by Ro (Iso 1 nmol/L + Ro 10 μ mol/L). Tetracaine (1 mmol/L) was used to measure SR Ca²⁺ leak, caffeine (10 mmol/L) to measure SR Ca²⁺ load. (B) Mean amplitude (\pm SEM) of SR Ca²⁺ leak in Ctrl (white bar), Iso (grey bar), and Iso+Ro (black bar,). (C) Mean amplitude (\pm SEM) of SR Ca²⁺ load in Ctrl, Iso and Iso+Ro. (D) Mean (\pm SEM) of fractional release in Ctrl, Iso and Iso+Ro. Number of cells is indicated inside each bar representing the mean of 6 to 7 independent experiments. Statistical significance is indicated as: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ (vs Ctrl); #, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$ (Iso vs Iso+Ro). ANOVA followed by a Tukey post hoc test.

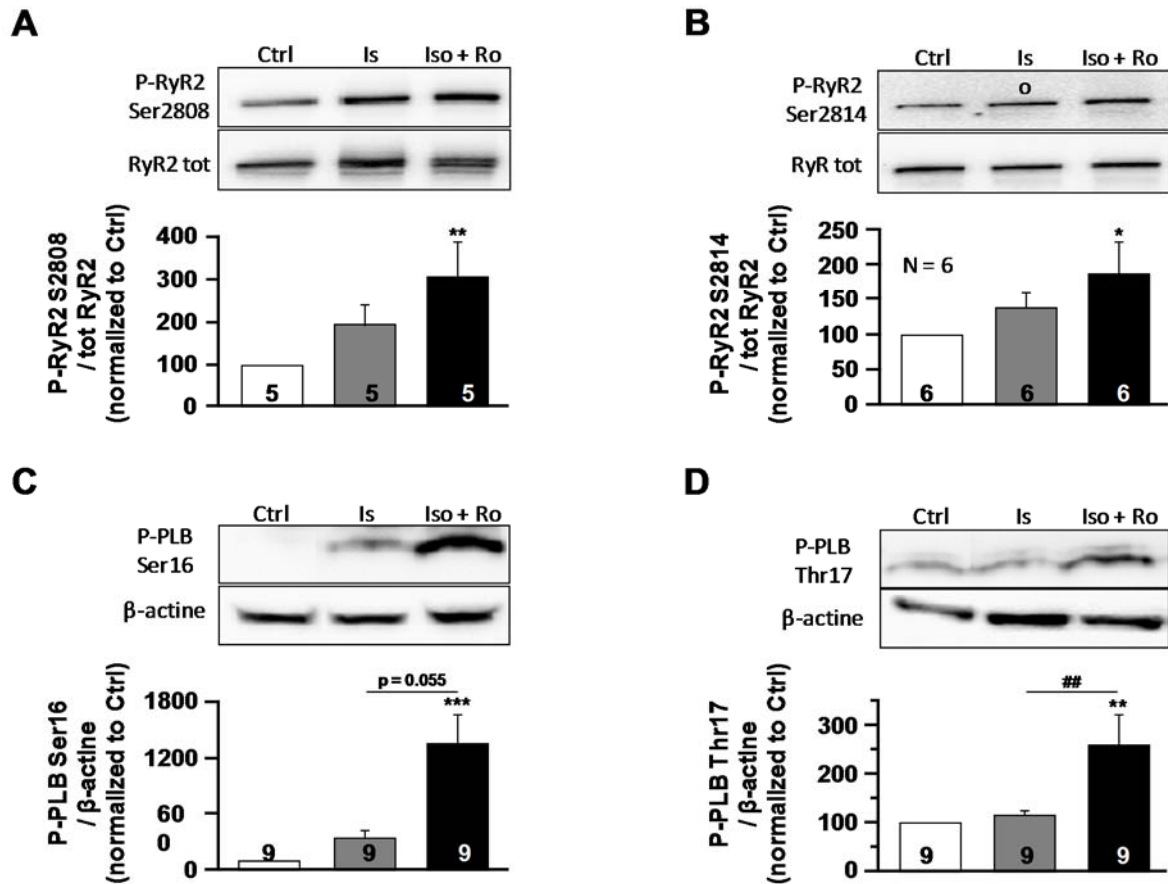


Figure 3: PDE4 inhibition unmasks the effect of sub-maximal β -AR stimulation on RyR2 and PLB phosphorylation. ARVMs were treated or not with 1 nmol/L Iso alone (Iso) or with 10 μ M Ro (Iso+Ro) for 5 min at 37°C. Twenty μ g of total protein extract were analysed by western blot using RyR2 phosphospecific antibodies at (A) Ser2808 (PKA site) and (B) Ser2814 (CaMKII site), and phospholamban phosphospecific antibodies at (C) Ser16 (PKA site) and (D) Thr17 (CaMKII site). RyR2 and PLB membranes were stripped and reprobed with total RyR2 antibodies or β -actin antibodies for RyR2 and PLB respectively, used as a loading control. Phosphorylated RyR2/total RyR2 ratios and phosphorylated PLB/ β -actin ratios were quantified and normalized to untreated ARVMs (Ctrl) and expressed as means \pm SEM from 5 to 9 independent experiments. Statistical significance is indicated as: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (vs. Ctrl); ##, $p < 0.01$ (Iso vs. Iso+Ro). Friedman test followed by a Dunn's multiple comparison post hoc test.

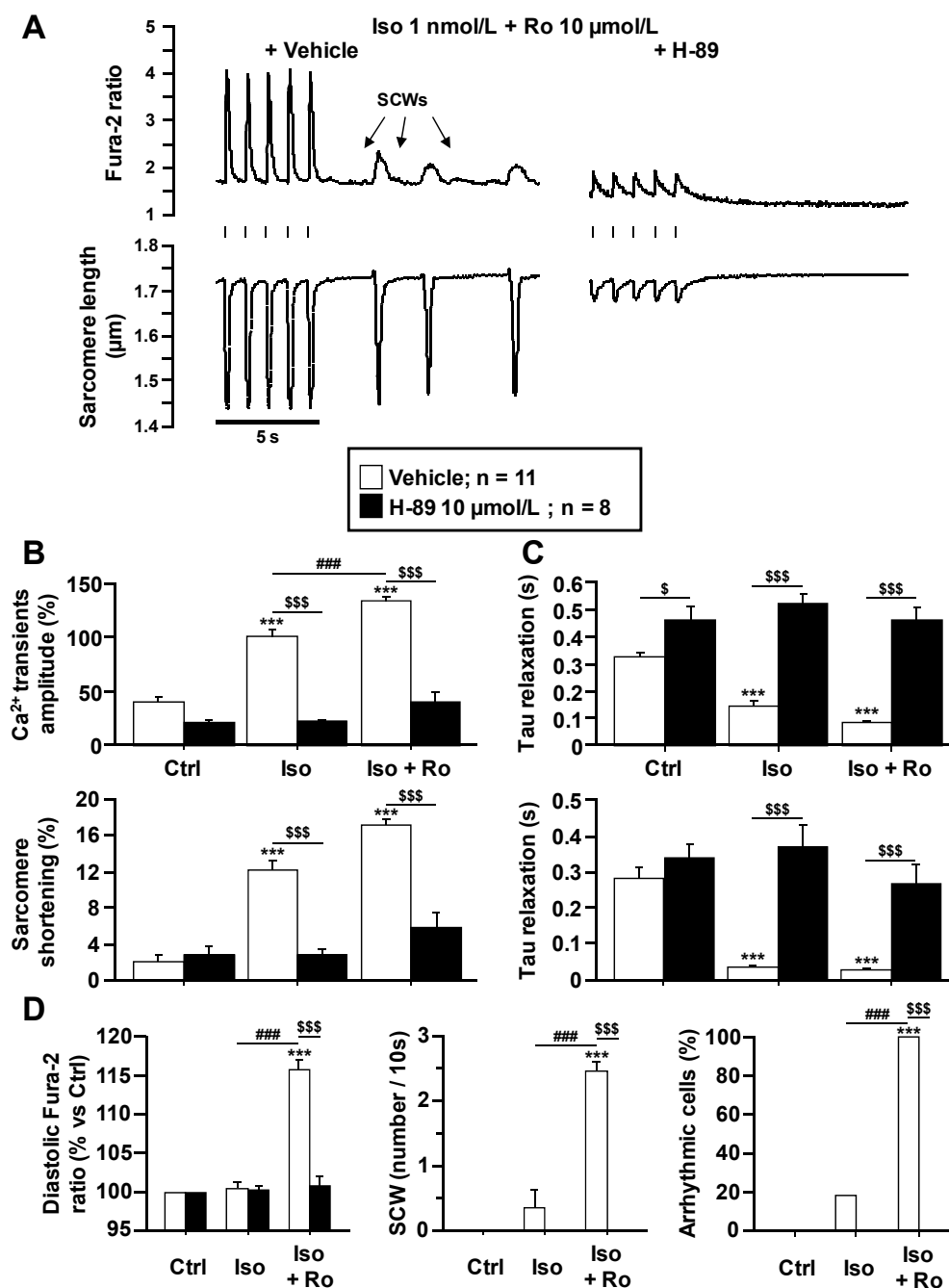


Figure 4: Effect of PKA inhibition on the regulation of the ECC by PDE4. (A) Representative traces of Ca²⁺ transients, sarcomere shortening and SCWs in Fura-2 loaded ARVMs upon β-AR stimulation with Iso 1 nmol/L +Ro 10 μM in the absence or presence of the PKA inhibitor H-89 (10 μmol/L). (B) Mean amplitude (±SEM) of Ca²⁺ transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl, Iso and Iso+Ro without inhibitor (white bars, n=11 cells, 3 rats) or with H-89 (black bars, n=8 cells, 3 rats). (C) Average relaxation kinetics (±SEM) for Ca²⁺ transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl, Iso and Iso+Ro ± H-89. (D) Percentage of variation of diastolic Fura-2 ratio (±SEM), average frequency of SCWs (±SEM) recorded during a 10 s pause in pacing and percentage of arrhythmic cells in Ctrl, Iso and Iso+Ro ± H-89. Statistical significance is indicated as: **, p<0.01; ***, p<0.001 (vs Ctrl); ###, p<0.001 (Iso vs. Iso+Ro); \$, p<0.05, \$\$, p<0.01; \$\$\$, p<0.001 (without inhibitor vs. H-89) and was tested using an ANOVA followed by a Tukey test for Ca²⁺ transients and sarcomere shortening, or by a Dunn test to analyse the occurrence of SCWs and a Chi² test followed by a Fischer exact test for differences in the percentage of arrhythmic cells.

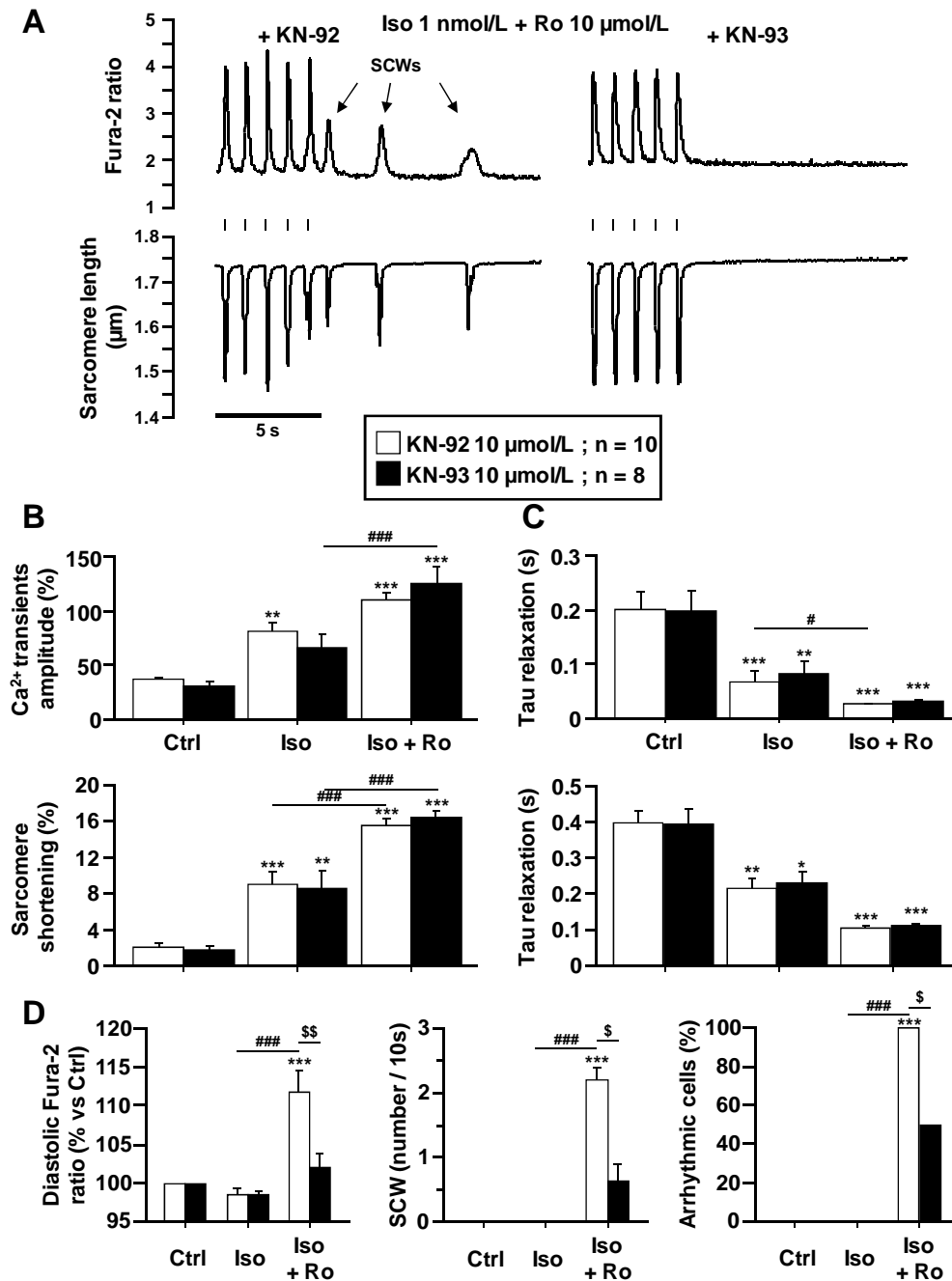


Figure 5: Effect of CaMKII inhibition on the regulation of the ECC by PDE4. (A) Representative traces of Ca²⁺ transients, sarcomere shortening and SCWs in Fura-2 loaded ARVMs upon β-AR stimulation with Iso 1 nmol/L + Ro 10 μM in the presence of the CaMKII inhibitor KN-93 (10 μmol/L) or its inactive analogue KN-92 (10 μmol/L). (B) Mean amplitude (±SEM) of Ca²⁺ transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl, Iso and Iso+Ro treated with KN-92 (white bars, n=10 cells, 3 rats) or with KN-93 (black bars, n=8 cells, 3 rats). (C) Average relaxation kinetics (±SEM) for Ca²⁺ transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl, Iso and Iso+Ro obtained from cells pre-incubated with 10 μmol/L KN-92 or KN-93. (D) Percentage of variation of the diastolic Fura-2 ratio (±SEM), average frequency of SCWs (±SEM) observed during a 10 s pause in pacing and percentage of arrhythmic cells in Ctrl, Iso and Iso+Ro in cells pre-incubated with 10 μmol/L KN-92 or KN-93. Statistical significance is indicated as: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 (vs Ctrl); ###, p<0.001 (Iso vs. Iso+Ro); \$, p<0.05, \$\$, p<0.01 (KN-92 vs. KN-93). ANOVA followed by a Tukey test was used to compare Ca²⁺ transients amplitude and sarcomere shortening; ANOVA and a Dunn post hoc test for the occurrence of SCWs; a Chi² test and a Fischer post-hoc exact test for the percentage of arrhythmic cells.

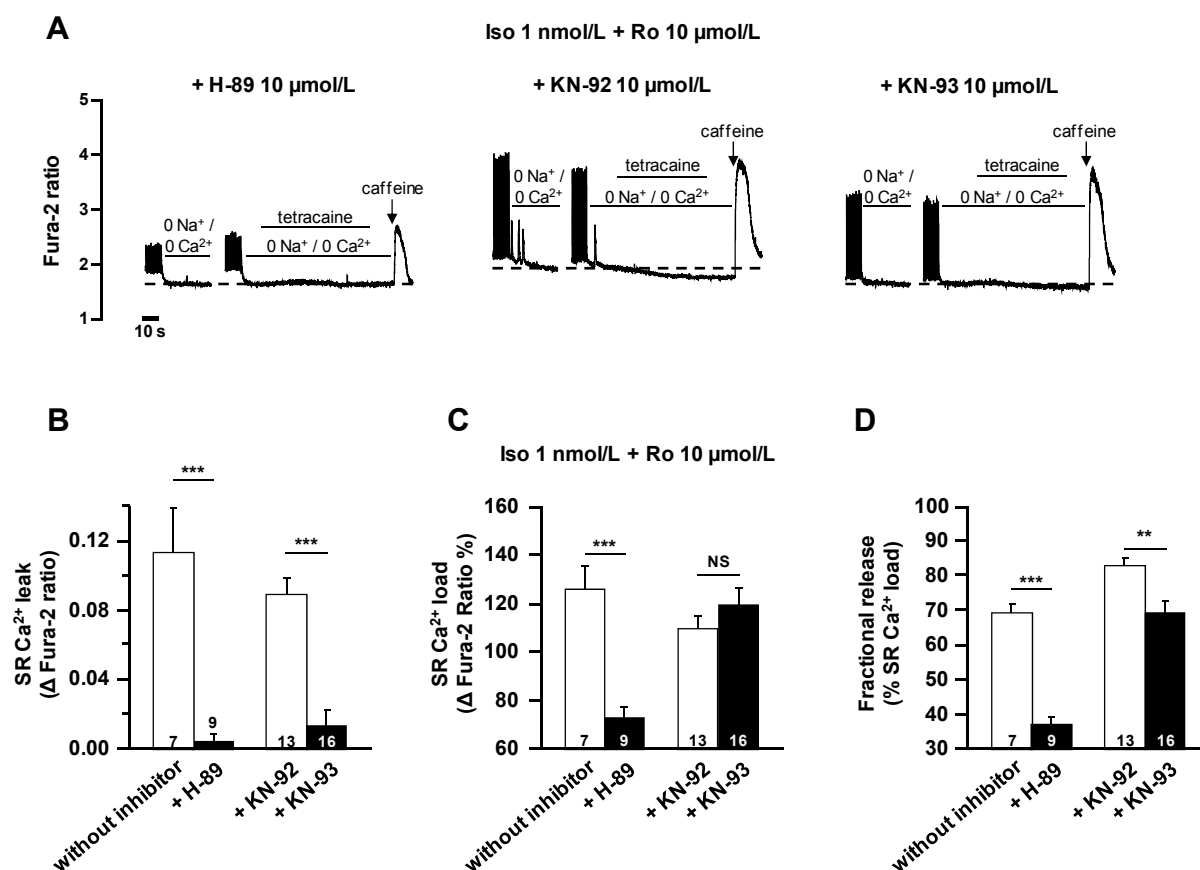


Figure 6: Effect of PKA and CaMKII inhibition on SR Ca²⁺ leak and load promoted by PDE4 inhibition and β-AR stimulation in ARVMs. (A) Representative traces of Ca²⁺ transients, sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ leak and load measured in Fura-2 loaded ARVMs paced at 1 Hz, upon isoproterenol (1 nmol/L) application and PDE4 inhibition with Ro (10 μmol/L) (Iso+Ro) in the presence of either the PKA inhibitor H-89 (10 μmol/L), or the CaMKII inhibitor KN-93 (10 μmol/L) or its inactive analogue KN-92 (10 μmol/L). Tetracaine (1 mmol/L) was used to estimate SR Ca²⁺ leak, caffeine (10 mmol/L) to measure SR Ca²⁺ load. (B) Mean amplitude (±SEM) of the SR Ca²⁺ leak recorded in Iso+Ro alone (left white bar, n=7 cells, 3 rats), in the presence of H-89 (left black bar), and in the presence of either KN-92 (right white bar) or KN-93 (right black bar). (C) Mean amplitude (±SEM) of SR Ca²⁺ load in Iso+Ro without kinase inhibitor, with H-89, KN-92 or KN-93. (D) Mean fractional release (±SEM) in Iso+Ro without inhibitor, in the presence of H-89, KN-92 or KN-93 (black bar). Number of cells is indicated inside each bar representing the mean of 3 to 5 independent experiments. Statistical significance is indicated as: **, p<0.01, ***, p<0.001 (ANOVA followed by a Tukey post hoc test).

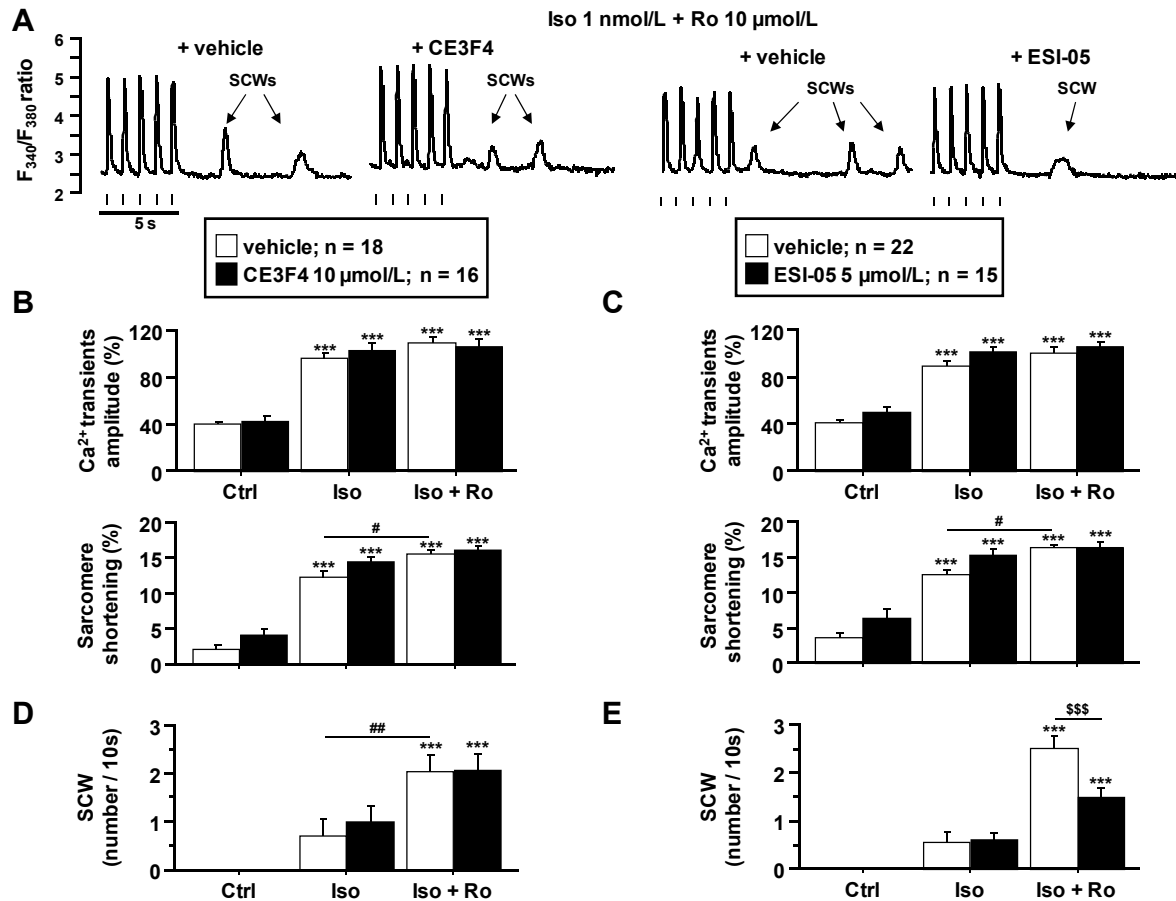


Figure 7: Effect of Epac1 and Epac2 inhibitors on the ECC and the occurrence of SCWs promoted by PDE4 inhibition upon β -AR stimulation. (A) Representative traces of Ca^{2+} transients and SCWs recorded in Fura-2 loaded ARVMs pre-incubated with vehicle (DMSO), the Epac 1 inhibitor CE3F4 (10 $\mu\text{mol/L}$) or the Epac 2 inhibitor ESI-05 (5 $\mu\text{mol/L}$) and challenged with Iso 1 nmol/L + Ro 10 $\mu\text{mol/L}$. (B) Mean amplitude ($\pm\text{SEM}$) of Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) recorded upon Ctrl, Iso and Iso+Ro from cells treated with either CE3F4 (black bars, $n=16$ cells, 6 rats) or vehicle (white bars, $n=18$ cells, 6 rats). (C) Same parameters from cells pre-incubated with ESI-05 (black bars, $n=15$ cells, 6 rats) or vehicle (white bars, $n=22$ cells, 6 rats). Average number of SCWs ($\pm\text{SEM}$) occurring during a 10 seconds pause in pacing under Ctrl, Iso or Iso+Ro conditions from cells treated with CE3F4 or ESI-05 or their respective vehicles are presented in (D) and (E) respectively. ***, $p<0.001$ (vs Ctrl); #, $p<0.05$ ##, $p<0.01$ (Iso vs. Iso+Ro); \$\$\$, $p<0.001$ (vehicle vs. ESI-05). ANOVA followed by a Tukey test for Ca^{2+} transients and sarcomere shortening, or by a Dunn test to analyse the occurrence of SCWs.

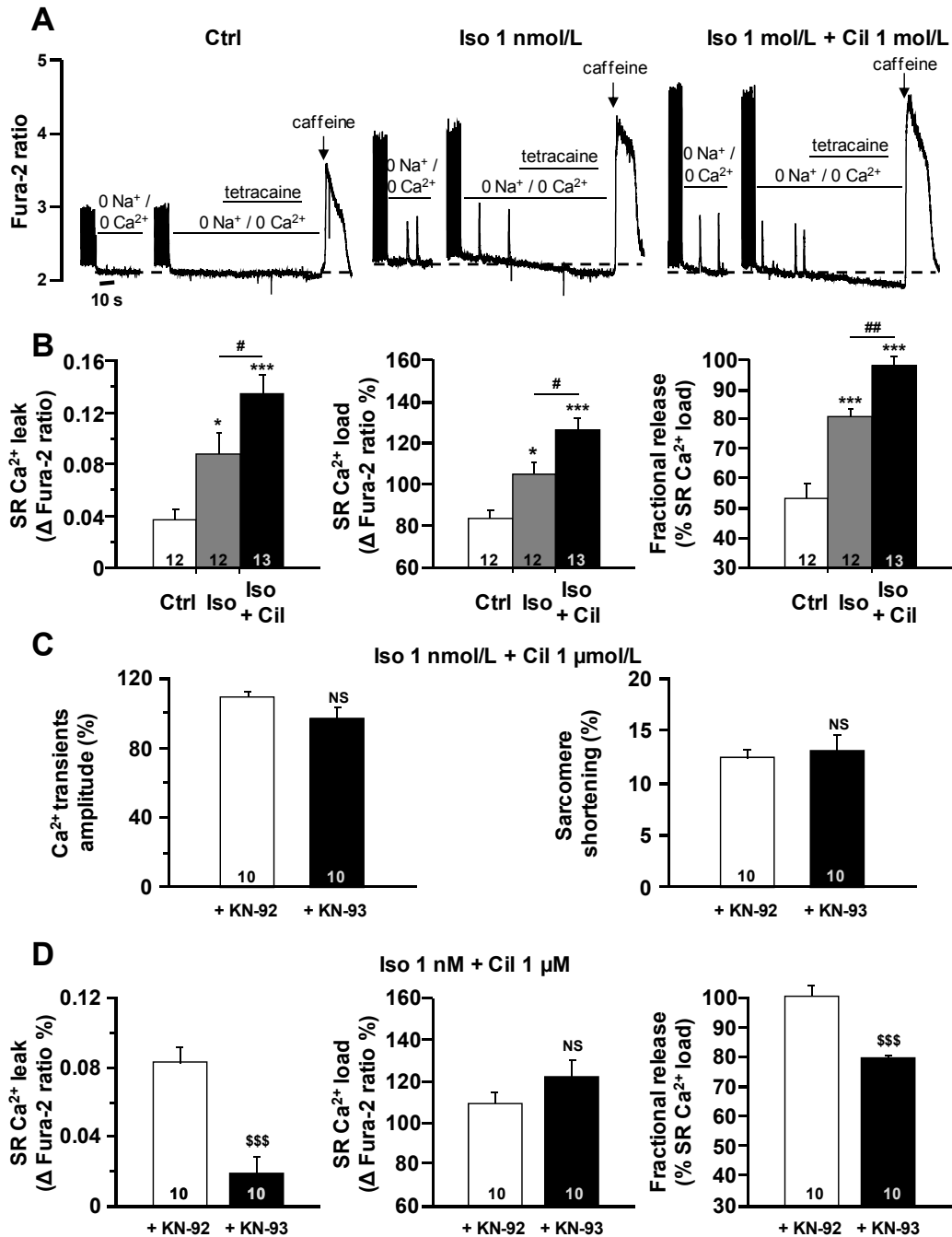


Figure 8: Effect of CaMKII inhibition on ECC, SR Ca²⁺ leak and load promoted by PDE3 inhibition upon β -AR in ARVMs. (A) Representative traces of Ca²⁺ transients, sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ leak and load measurements obtained in Fura-2 loaded ARVMs paced at 1 Hz, under basal conditions (Ctrl), upon β -AR stimulation with Iso (1 nmol/L) alone or with concomitant PDE3 inhibition by cilostamide (Iso 1 nmol/L + Cil 1 μ mol/L). Tetracaine (1 mmol/L) was used to measure SR Ca²⁺ leak, caffeine (10 mmol/L) was used to measure SR Ca²⁺ load. (B) Mean amplitude (\pm SEM) of SR Ca²⁺ leak (left panel), SR Ca²⁺ load (middle panel) and fractional release (right panel) recorded in Ctrl (white bar), Iso (grey bar), and Iso+Cil (black bar). (C) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca²⁺ transients (left panel) and sarcomere shortening (right panel) in Iso+Cil with 10 μ mol/L KN-92 (white bar) or 10 μ mol/L KN-93 (black bar). (D) Mean amplitude (\pm SEM) of SR Ca²⁺ leak (left graph), SR Ca²⁺ load (middle panel) and fractional release (right panel) measured in Iso+Cil condition in the presence of 10 μ mol/L KN-92 (white bar) or 10 μ mol/L KN-93 (black bar). Number of cells is indicated inside each bar representing the mean of 3 to 4 independent experiments. Statistical significance is indicated as: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ (vs. Ctrl); #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ (Iso vs. Iso+Cil); \$\$\$, $p < 0.001$ (Iso+Cil+KN-92 vs. Iso+Cil+KN-93). (ANOVA followed by a Tukey post hoc test).

Supplementary material

METHODS

Reagents

Isoproterenol from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France) was freshly prepared each day in a 1 mg/mL ascorbic acid solution at 10 mmol/L (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). Stock solutions for PDE, Epac1 and Epac2 and kinases inhibitors were stored at -20°C: Ro 20-1724 (10 mmol/L in EtOH) [Ro, 4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone] from Calbiochem (Darmstadt, Germany), Cilostamide (10 mmol/L in H₂O) [Cil, N-Cyclohexyl-N-methyl-4-(1,2-dihydro-2-oxo-6-quinolyloxy)butyramide] from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Stock solutions of H-89 (N-[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride) from Tocris Bioscience (Bristol, UK) at 10 mmol/L were prepared in H₂O. KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine) and its inactive analogue KN-92 (2-[N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine, phosphate) were from Calbiochem (Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, France) and dissolved at 9 mmol/L in DMSO. CE3F4 (6-Fluoro-5,7-dibromo-2-methyl-1-formyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline) was kindly provided by Pascal Bouyssou (Institut de Chimie Organique et Analytique, Orléans, France) and prepared as a stock solution at 12 mmol/L in DMSO and ESI-05 at 50 mmol/L in DMSO (4-Methylphenyl-2, 4, 6-trimethylphenylsulfone) was from BioLog (Bremen, Germany). Vehicles used to prepare stocks were added to control solutions at the same final concentrations. Caffeine from Merck (Darmstadt, Germany) was freshly prepared in Ringer solution at 10 mmol/L. Tetracaine from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) was freshly prepared in 0Na⁺/0Ca²⁺ Ringer (see composition below) at 1 mmol/L.

Cardiomyocytes isolation and culture

Male Wistar rats (250 – 300 g) were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (0.1 mg/g) and hearts were excised rapidly. Individual ARVMs were obtained by retrograde perfusion of the heart as previously described.¹ For enzymatic dissociation, the hearts were perfused at a constant flow of 6 mL/min at 37 °C with a Ca²⁺-free Ringer solution containing (in mmol/L): NaCl 117, KCl 5.7, NaHCO₃ 4.4,

KH₂PO₄ 1.5, MgCl₂ 1.7, D-glucose 11.7, Na-phosphocreatine 10, taurine 20, and 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) 21, pH 7.1 during 5 min, followed by a perfusion at 4 mL/min for 40 min with the same solution containing 1 mg/mL of collagenase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) plus 300 µmol/L ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and CaCl₂ to adjust free Ca²⁺ concentration to 20 µmol/L. The ventricles were then separated from atria, finely chopped, and gently agitated to dissociate individual cells. The resulting cell suspension was filtered on gauze, and the cells were allowed to settle down. The supernatant was discarded and cells resuspended four more times with Ringer solution at increasing [Ca²⁺] from 20 to 300 µmol/L. Freshly isolated cells were suspended in minimal essential medium (MEM: M 4780; Sigma, St Louis, MO USA) containing 1.2 mmol/L [Ca²⁺] supplemented with 2.5% foetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1% penicillin – streptomycin (P-S), 20 mmol/L HEPES (pH 7.6), and plated on 35 mm, laminin-coated (10 mg/mL) culture dishes at a density of 10⁴ cells per dish and kept at 37°C (0.5% CO₂). After 1 h, the medium was replaced by 300 µL of FBS-free MEM. All IonOptix experiments were performed on cells after at least 1h FBS deprivation.

Measurements of Ca²⁺ transients, sarcomere shortening, SR Ca²⁺ leak and load

All experiments were performed at room temperature. Isolated ARVMs were loaded with 1 µmol/L Fura-2 AM (Invitrogen) for 15 min in a Ringer solution containing (in mmol/L): KCl 5.4; NaCl 121.6; Na-pyruvate 5; NaHCO₃ 4.013; NaH₂PO₄ 0.8; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 1.8; glucose 5 and HEPES 10 (pH 7.4 with NaOH). Sarcomere shortening and Fura-2 ratio (measured at 512 nmol/L upon excitation at 340 and 380 nmol/L) were simultaneously recorded in Ringer solution, using a double excitation spectrofluorimeter coupled with a video detection system (IonOptix, Milton, MA, USA). Myocytes were electrically stimulated with biphasic field pulses (5 V, 4 ms) at a frequency of 1 Hz as previously described.¹ In each experimental condition, after Ca²⁺ transients reached a steady state, a 10 s pause of electrical stimulation allowed to assess the occurrence of spontaneous Ca²⁺ release events (SCWs). Because arrhythmias depend on the initial quality of cells, cardiomyocytes exhibiting spontaneous Ca²⁺ waves (SCWs) when perfused with control Ringer solution were discarded.

SR Ca^{2+} leak and load were measured according to a dedicated protocol.² Fura-2 loaded ventricular myocytes were paced by field stimulation at 1 Hz in normal Ringer for few minutes until cellular Ca^{2+} transients reached a steady state. Directly after the last pulse, normal Ringer was substituted for 30 s by a $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ Ringer in which Na^+ was replaced by Li^+ and supplemented with 10 mmol/L EGTA. This condition allowed measuring intracellular Ca^{2+} levels in a closed system without trans-sarcolemmal Ca^{2+} fluxes. Then, the cell was switched back to normal Ringer and paced at 1 Hz until Ca^{2+} transients amplitude and sarcomere shortening reached steady-state. Again, following the last pulse, cells were perfused for 30 s with a $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ solution including 1 mmol/L of the RyR2 inhibitor tetracaine. As a consequence, SR Ca^{2+} leak into the cytoplasm was prevented. SR Ca^{2+} leak was estimated as the difference between the Fura-2 ratio recorded at the end of the $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ Ringer perfusion with and without tetracaine. At the end of this protocol, tetracaine was washed out for at least 30 seconds and 10 mmol/L caffeine was applied to evaluate the total SR Ca^{2+} content.

Cell extracts and western blot analysis

Intact ventricular myocytes plated on laminin-coated culture dishes in Ringer solution for 1h were exposed to 5 min incubation in stimulation solution (Ctrl, Iso, Iso + Ro in Ringer solution) at 37°C. Then, cells were lysed in cold RIPA (Radio-Immuno-precipitation Assay) lysis buffer containing (in mmol/L): Tris-HCl 50 (pH 7.4), NaCl 150, EDTA 2, 1% NP40, 1% DOC, SDS 0.1% supplemented with a protease inhibitor (Complete Mini EDTA-free, Roche) and a phosphatase inhibitor (PhosSTOP, Roche) mixtures. Lysates were centrifuged for 10 min at 10 000 g and at 4°C, and the supernatant assayed for protein concentration using a FBS gradient. Then, protein samples were separated in denaturing acrylamide gels, and then transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked using 5% skimmed milk for 45 min before the incubation with primary antibodies diluted in 5% skimmed milk solution over night at 4°C. Phosphorylation of PLB at Ser16 and Thr17 and RyR2 at Ser2808 and Ser2814 were detected using specific rabbit polyclonal antibodies from Badrilla (used at concentrations of 1/5000, 1/10000, 1/5000 and 1/5000, respectively). β -actin quantification was used as a loading control and assessed on PLB membranes with specific mouse polyclonal antibodies from Santa Cruz (used at a concentration of 1/20000). After incubation

with anti-rabbit secondary antibodies coupled with peroxidase for 1h, proteins were visualized by enhanced chemoluminescence. Phospho-RyR2 membranes were stripped and reprobed with specific mouse polyclonal antibodies from Cell Signaling Technology against total RyR2 used as a loading control. Quantification was carried out with Quantity one software, each sample being normalized to β -actin for PLB quantification, and to total RyR2 for phospho-RyR2 quantification.

FRET Measurements of PKA Activity

PKA activity was measured with the FRET-based A-kinase activity reporter 3 (AKAR3)³ exhibiting a specific cytoplasmic localization (NES) to avoid nucleus localization⁴. After 2h of culture in MEM containing FBS, the medium was replaced by MEM without FBS containing an adenovirus encoding the PKA sensor AKAR3-NES at a multiplicity of infection of 200 pfu/cell and myocytes were kept for 48h at 37°C (0.5% CO₂). Prior to the experiments, cardiomyocytes were maintained in a Ringer solution at room temperature (20-25°C) for at least 5 min. Images were captured every 5 s using the 40x oil immersion objective of an inverted microscope (Nikon) connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices) cooled charge coupled camera (Cool SNAP HQ2). Dual emission imaging of CFP and YFP was performed using a Dualview emission splitter equipped with a 510LP dichroic mirror and BP filters 480/30 nm and 535/25 nm. Cyan Fluorescent Protein (CFP) was excited during 300 ms by a Xenon lamp (Nikon) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual-emission imaging of CFP and Yellow Fluorescent Protein (YFP) was performed using a Dual-View emission splitter equipped with a 510 LP dichroic mirror and BP filters 480/30 and 535/25 nm, respectively.

Average fluorescence intensity measured with AKAR3-NES was measured in the entire cell. Background was subtracted and YFP intensity was corrected for CFP bleed through before calculating the ratio. Ratio images were obtained with the ImageJ software.

Data analysis

Ca²⁺ transient amplitude was measured by dividing the twitch amplitude (difference between the end-diastolic and the peak systolic ratios) by the end-diastolic ratio, thus corresponding to the percentage of variation in the Fura-2 ratio. Similarly, sarcomere shortening was assessed by its percentage of variation, which is obtained by dividing the twitch amplitude (difference between the end-diastolic and the peak systolic sarcomere length) by the end-diastolic sarcomere length. Relaxation kinetics were estimated by a non-linear fit of the decaying part of the Ca²⁺ transient and sarcomere shortening traces with the following equation: $X(t) = A \cdot \exp(-(t/\tau)) + A_0$, where t_0 is zero time, A_0 the asymptote of the exponential, A the relative amplitude of the exponential, and τ is its time constant of relaxation. SR Ca²⁺ leak was measured by subtracting the ratio of fluorescence recorded in steady-state in 0Na⁺/0Ca²⁺ Ringer with tetracaine from the ratio recorded in steady-state in 0Na⁺/0Ca²⁺ Ringer without tetracaine. SR Ca²⁺ load was calculated by dividing the caffeine-induced twitch amplitude by the basal Fura-2 ratio measured before tetracaine application. Fractional release was calculated as the ratio of Ca²⁺ transient amplitude divided by caffeine-induced twitch amplitude. All parameters were calculated offline on a dedicated software (IonWizard 6x, IonOptix). All results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance within multiple groups, was determined using a One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey post hoc test, a Friedman test followed by a Dunn's multiple comparisons post hoc test, a Kruskal-Wallis test with a Dunn post hoc test, a Mann-Whitney test or a Chi² test followed by a Fischer exact test when appropriate. Differences with P-values <0.05 were considered as statistically significant. The number of independent experiments performed is indicated in the figure legends.

Supplementary Figures

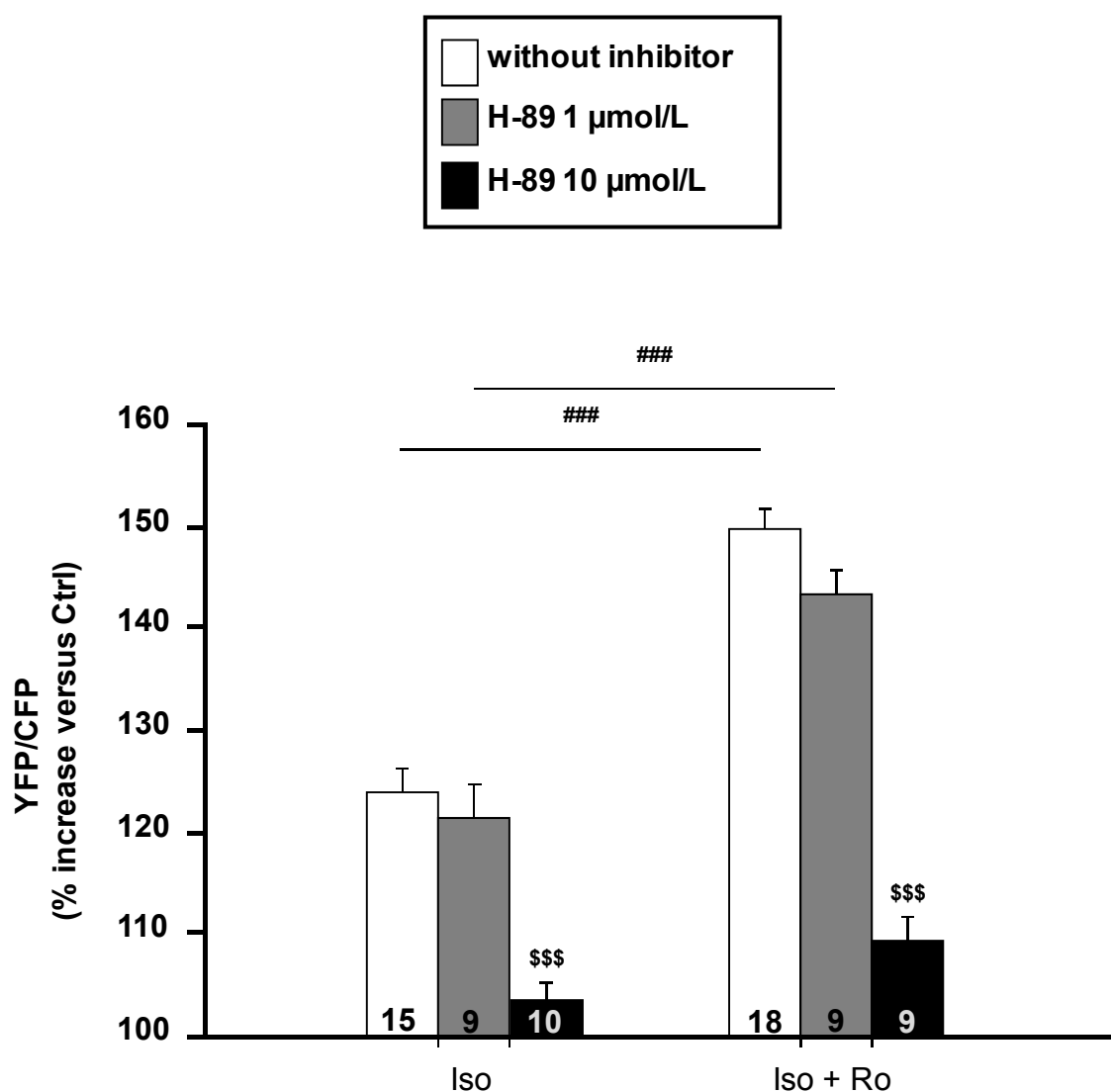


Figure S1. Effect of H-89 on the cytoplasmic PKA activity in ARVMs upon β -AR stimulation and PDE4 inhibition. Mean variation (\pm SEM) of the YFP/CFP ratio over Ctrl upon stimulation with Iso (1 nmol/L) and with Iso+Ro, in the absence (white bars) or presence of the PKA inhibitor H-89 at 1 $\mu\text{mol/L}$ (grey bars) and 10 $\mu\text{mol/L}$ (black bars) in ARVMs expressing AKAR3-NES. The number inside the bars indicates the number of cells obtained from 2 to 3 rats. Statistical significance is indicated as: ***, $p < 0.001$ (vs without inhibitor), Kruskal-Wallis followed by a Dunn's multiple comparison post hoc test), ###, $p < 0.001$ (Iso vs. Iso+Ro) (Mann-Whitney test).

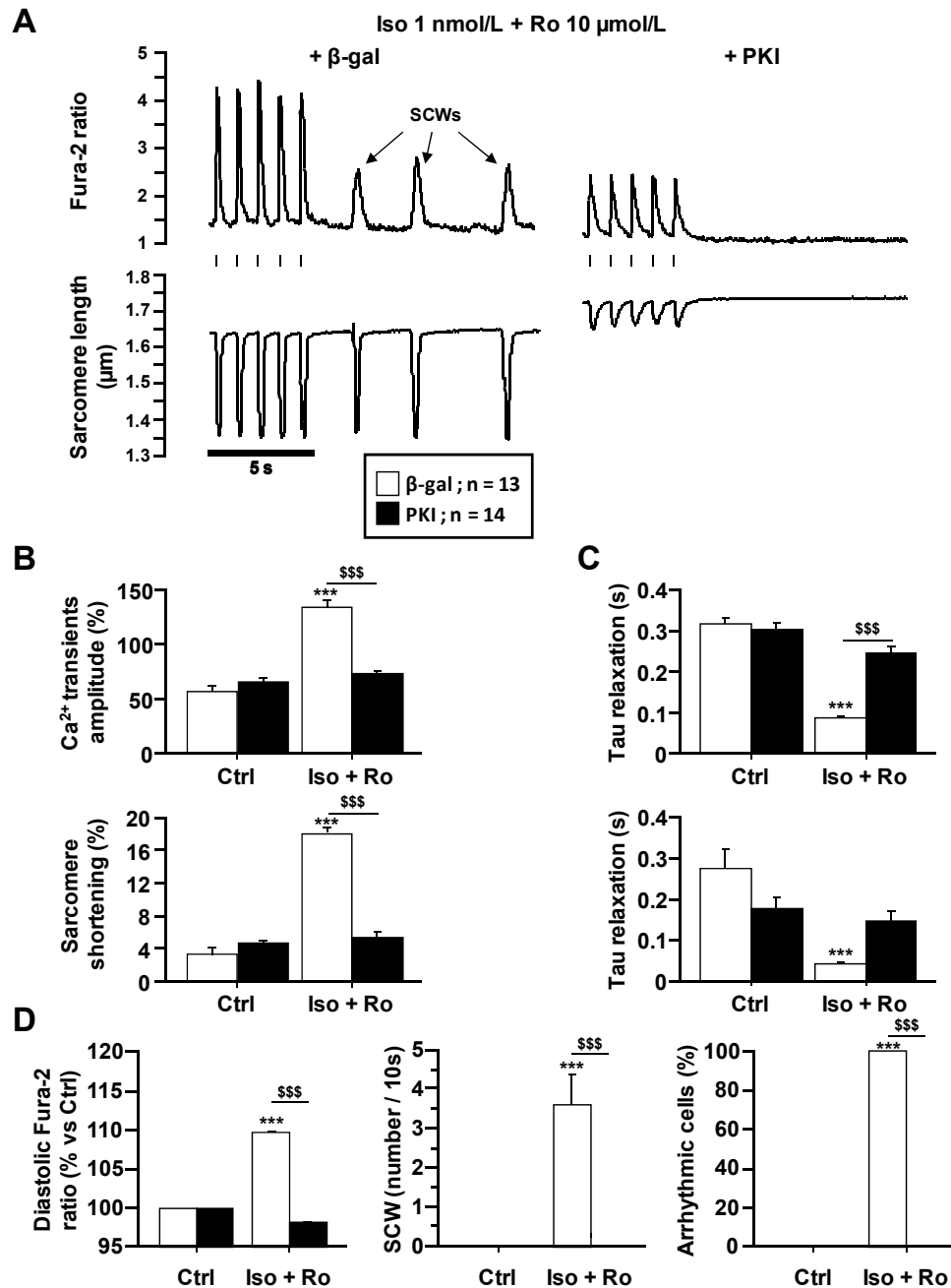


Figure S2: PKI abolishes the effect of concomitant β -AR stimulation and PDE4 inhibition on ECC and SCWs. (A) Representative traces of Ca^{2+} transients and SCWs recorded in ARVMs paced at 1 Hz, upon concomitant β -AR stimulation with Iso (1 nmol/L) and PDE4 inhibition with Ro (10 $\mu\text{mol/L}$) in cells overexpressing either β -Galactosidase (β -Gal) or the specific protein kinase A inhibitor, PKI. (B) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl and upon Iso+Ro application in cells expressing either β -Gal (white bars, n=13 cells, 3 rats) or PKI (black bars, n=14 cells, 4 rats). (C) Average relaxation kinetics (\pm SEM) for Ca^{2+} transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl and Iso+Ro in cells expressing either β -Gal or PKI. (D) Percent variation of diastolic Fura-2 ratio (\pm SEM), average number of SCWs (\pm SEM) recorded during a 10 s pause in pacing, and percentage of arrhythmic cells in Ctrl and Iso+Ro, in cells expressing β -Gal or PKI. Statistical significance is indicated as: ***, $p < 0.001$ (vs Ctrl); \$\$\$, $p < 0.001$ (β -Gal vs. PKI). ANOVA followed by a Tukey post hoc test was used for Ca^{2+} transients amplitude and sarcomere shortening; ANOVA followed by a Dunn post hoc test was used to analyse the occurrence of SCWs and a χ^2 test followed by a Fischer exact test was used to evaluate significant differences in the percentage of arrhythmic cells.

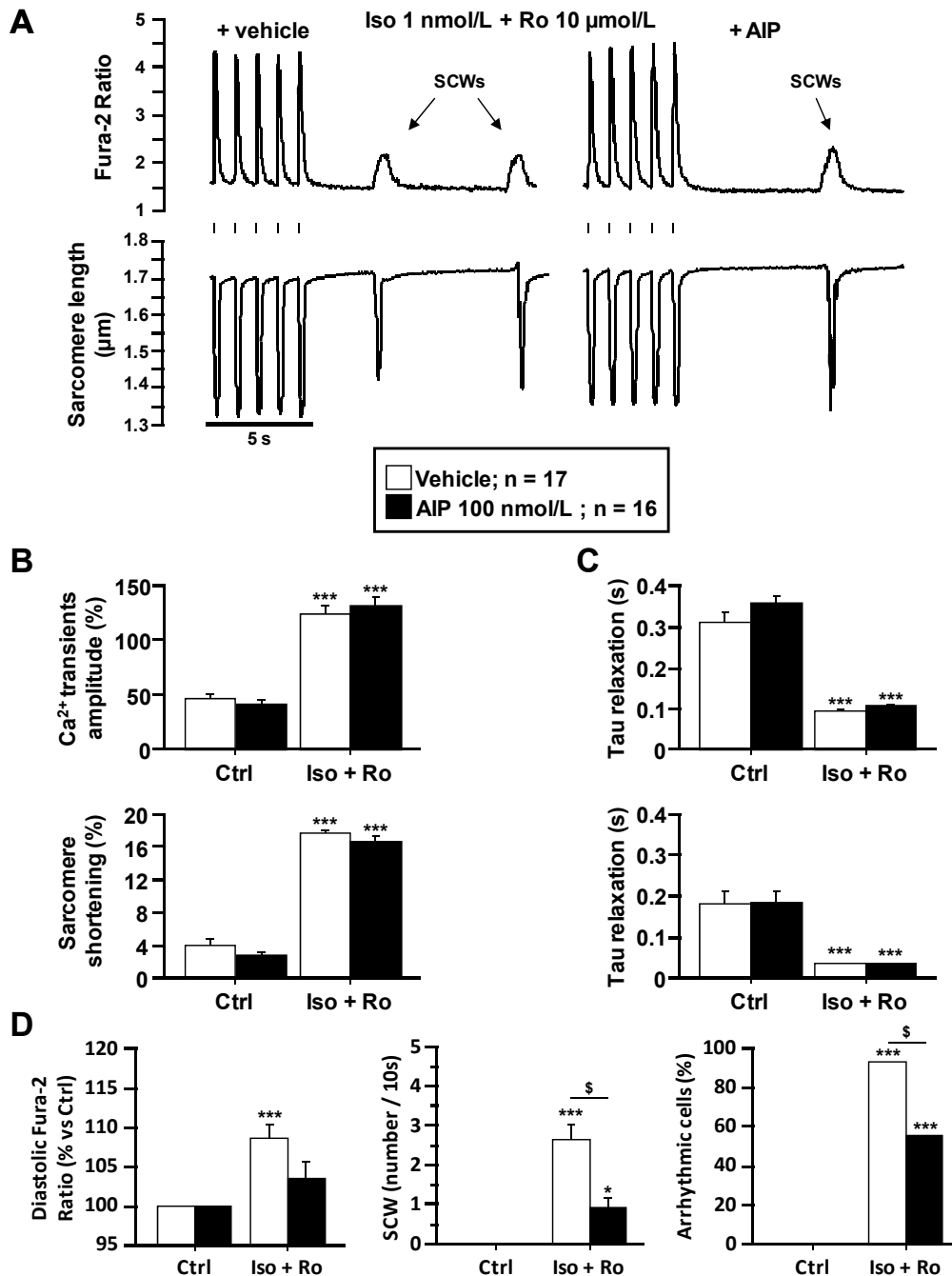


Figure S3: Effect of AIP on promoted ECC and SCWs by concomitant β -AR stimulation and PDE4 inhibition. (A) Representative traces of Ca²⁺ transients and SCWs recorded in ARVMs paced at 1 Hz, upon concomitant β -AR stimulation with isoproterenol (Iso, 10 nmol/L) and PDE4 inhibition with Ro (10 μ mol/L) in cells pre-incubated with the AIP peptide inhibitor of CaMKII or its vehicle. (B) Mean amplitude (\pm SEM) of Ca²⁺ transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) recorded under Ctrl and Iso+Ro conditions in cells pre-incubated either with vehicle (white bars, n=17 cells, 4 rats) or AIP (black bars, n=16 cells, 4 rats). (C) Average relaxation kinetics (\pm SEM) for Ca²⁺ transients (upper graph) and sarcomere shortening (lower graph) in Ctrl and Iso+Ro in cells incubated or not with AIP. (D) Percentage of variation of diastolic Fura-2 ratio (\pm SEM), average number of SCWs (\pm SEM) recorded during a 10 s pause in pacing, and percentage of arrhythmic cells in Ctrl and Iso+Ro \pm AIP. Statistical significance is indicated as: ***, $p < 0.001$ (vs Ctrl), \$, $p < 0.05$ (no inhibitor vs. AIP). ANOVA followed by a Tukey post hoc test was used for Ca²⁺ transients amplitude and sarcomere shortening; ANOVA followed by a Dunn post hoc test was used to analyse the occurrence of SCWs and a Chi² test followed by a Fischer exact test to analyze significant differences in the percentage of arrhythmic cells.

REFERENCES

1. Mika D, Bobin P, Pomerance M, Lechene P, Westenbroek RE, Catterall WA, Vandecasteele G, Leroy J, Fischmeister R. Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by camp phosphodiesterase subtypes. *Cardiovascular research*. 2013;100:336-346
2. Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the sr ca^{2+} leak-load relationship. *Circulation research*. 2002;91:594-600
3. Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase a activity visualized by fret-based reporters. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;348:716-721
4. Haj Slimane Z, Bedioune I, Lechene P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, Domergue-Dupont V, Dewenter M, Richter W, Conti M, El-Armouche A, Zhang J, Fischmeister R, Vandecasteele G. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase a by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovascular research*. 2014;102:97-106

C. Conclusions

Dans cette étude, nous avons d'abord montré que l'inhibition des PDE3 et des PDE4 lors d'une stimulation β -AR provoque la survenue de VCS pro-arythmiques. Nous avons également montré que la PKA et la CaMKII sont toutes les deux activées dans ces conditions expérimentales et phosphorylent les protéines clés du CEC : le PLB et le RyR2.

L'inhibition des PDE3 et PDE4 provoque une potentialisation des effets inotropes positifs d'une stimulation β -AR submaximale. Nous avons pu montrer que cet effet inotrope positif lié à l'inhibition des PDE4 est principalement lié à l'activité de la PKA et notamment à son action de phosphorylation du PLB sur le site Ser 16 qui permet d'augmenter le repompage de Ca^{2+} du cytoplasme vers le RS, couplée à son action de phosphorylation du RyR2 sur le site Ser 2808 (pour PDE3 : Mika et al. 2013). Ces deux actions contribuent à augmenter la sensibilité au Ca^{2+} du RyR2, expliquant l'augmentation de la fraction de Ca^{2+} du contenu du RS libérée à chaque transitoire Ca^{2+} (*fractional release*) que nous observons en présence des inhibiteurs de PDE.

Nous avons également montré que l'inhibition des PDE3 et PDE4 lors d'une stimulation β -AR provoque l'apparition de VCS qui corrélerent avec des niveaux de Ca^{2+} diastolique augmentés. J'ai donc mis au point un protocole de mesure de fuite et de charge en Ca^{2+} du RS qui nous a permis de montrer que dans ces conditions, l'augmentation de Ca^{2+} diastolique observée est due à une fuite de Ca^{2+} du RS vers le cytosol *via* les RyR2. Nous avons ensuite pu relier cette fuite de Ca^{2+} du RS à la fois à l'activation de la PKA qui permet, comme décrit ci-dessus, d'augmenter le contenu en Ca^{2+} du RS et peut-être également d'augmenter la sensibilité au Ca^{2+} du RyR2, et à l'activation de la CaMKII qui permet elle-aussi d'augmenter la sensibilité au Ca^{2+} du RyR2. En effet, lors d'une stimulation β -AR et d'une inhibition concomitante des PDE3 ou des PDE4, l'inhibition de la CaMKII entraîne une diminution de la *fractional release* sans modifier le contenu en Ca^{2+} du RS. A la lumière de ces résultats, nous pouvons donc penser que la PKA et la CaMKII agissent en synergie dans les mécanismes pro-arythmiques des inhibiteurs de PDE3 et de PDE4. La PKA serait ainsi principalement impliquée dans la régulation de l'activité de SERCA2a et donc dans le contrôle de la charge en Ca^{2+} du RS. Elle serait également associée à l'action de la CaMKII dans la sensibilisation du RyR2 au Ca^{2+} , soit directement par la phosphorylation de la Ser 2808, soit indirectement par l'augmentation du contenu de Ca^{2+} du RS, qui est connue pour augmenter la probabilité d'ouverture du RyR2. Ce sont donc ces deux paramètres, le maintien

d'un contenu de Ca^{2+} du RS élevé couplé à un état de sous-conductance du RyR2, qui seraient à l'origine de la fuite de Ca^{2+} du RS observée lors d'une stimulation β -AR et d'une inhibition concomitante des PDE3 ou des PDE4.

Enfin, cette étude nous a permis de montrer que si l'activité de la PKA est un paramètre nécessaire pour l'apparition d'une fuite de Ca^{2+} du RS, la voie d'activation de la CaMKII indépendante de la PKA joue également un rôle dans les mécanismes cellulaires pro-arythmiques observés lors d'une inhibition des PDE4 sous stimulation β -AR. Cette voie faisant intervenir Epac2 n'apparaît cependant pas majoritaire dans nos conditions expérimentales, l'inhibition d'Epac2 ne permettant qu'une diminution partielle de la fréquence de survenue de VCS pro-arythmiques. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par l'équipe de D. Bers dans les souris invalidées pour le gène codant pour Epac2 dans lesquels la fréquence des sparks induites par l'isoproterenol est réduite (Pereira et al. 2013).

Les résultats de mon étude illustrent donc le potentiel des inhibiteurs de PDE3 et de PDE4 dans l'augmentation de la fonction cardiaque chez le rat, mais soulignent également leur effet pro-arythmique dû à une fuite de Ca^{2+} du RS *via* les RyR2. Si la PKA joue un rôle essentiel dans les mécanismes cellulaires conduisant à l'effet inotrope positif observé et un rôle important dans la régulation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire, la CaMKII semble pour sa part réguler plus spécifiquement l'activité des RyR2 et par conséquent la fuite de Ca^{2+} . Ces résultats suggèrent donc la possibilité d'une action ciblant la CaMKII pour atténuer les effets délétères pro-arythmiques des inhibiteurs de PDE3 et de PDE4 chez le rongeur.

IV. Rôle des PDE3 et des PDE4 dans la prévention des arythmies chez le cochon, implication de la CaMKII

A. Introduction

Avec l'étude précédente, nous avons montré que si les inhibiteurs de PDE3 et de PDE4 permettent d'augmenter la fonction cardiaque, ils présentent également des effets pro-arythmiques qui impliquent à la fois la PKA et la CaMKII. Comme mentionné en introduction, les inhibiteurs de PDE, et notamment de la PDE3, sont utilisés chez l'Homme comme cardiostimulants, notamment dans le traitement de l'IC aigüe, mais leur prescription est limitée du fait de l'accroissement du risque de développer des arythmies chez ces patients. Néanmoins, le rongeur ne représente pas le modèle animal possédant la physiologie cardiaque la plus proche de celle de l'Homme, comme en témoigne le profil d'expression des différentes familles de PDE qui varie de manière importante pour trois des quatre principales familles de PDE cardiaques dégradant l'AMPc (Richter et al. 2011). Ainsi, les PDE3 représentent la principale famille de PDE exprimées au niveau cardiaque chez l'Homme, tandis que les PDE4 y représentent une part moins élevée que chez le rongeur. Il apparaît donc important d'évaluer les rôles respectifs de ces deux familles de PDE dans un modèle plus proche de la physiologie cardiaque humaine.

Dans ce but, nous avons réalisé une nouvelle étude destinée à évaluer le rôle des PDE3 et des PDE4 dans la prévention des arythmies dans un modèle porcin plus proche de la physiologie cardiaque humaine. Dans un premier temps, nous avons évalué la contribution respective des PDE3 et des PDE4 dans la dégradation des signaux AMPc dans le cardiomyocyte de cochon en conditions basales et sous stimulation β -AR. Si l'activité des PDE a déjà été mesurée *in vitro* dans cette espèce (Zimmermann et al. 1994), l'étude que j'ai réalisée grâce à la technique de FRET constitue une première sur myocytes vivants de cochon. Nous avons ensuite déterminé le rôle des PDE3 et des PDE4 dans le maintien de l'homéostasie Ca^{2+} et la prévention des arythmies en étudiant les effets d'inhibiteurs sélectifs de ces deux familles de PDE sur les transitoires Ca^{2+} et la contraction cellulaire enregistrées dans des cardiomyocytes isolés de cœurs de cochon. Enfin, nous avons étudié l'implication de la CaMKII dans les mécanismes cellulaires impliqués dans la survenue de VCS pro-arythmiques dans ce modèle.

B. Résultats

La **Figure 1** représente les effets moyens des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 seuls, combinés entre eux (**Figure 1.A**), ou combinés avec une stimulation β -AR avec 10 nM d'Iso (**Figure 1.B**). Les PDE3 et à un degré moindre les PDE4 régulent les niveaux d'AMPc en conditions basales dans le cardiomyocyte ventriculaire de cochon, et leur activité est très fortement augmentée lorsque les taux d'AMPc sont augmentés par l'inhibition concomitante des PDE3 et des PDE4 ou bien dans le cas d'une stimulation β -AR.

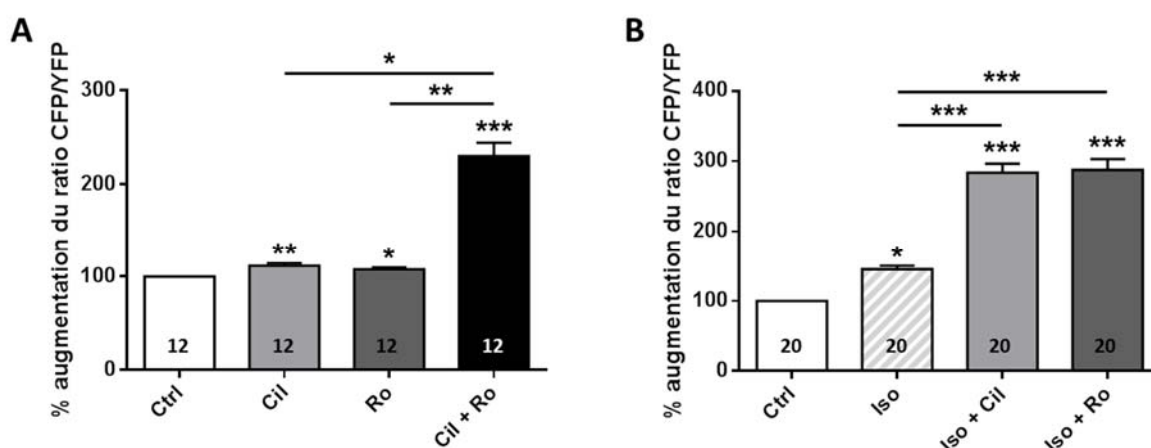


Figure 1 : Effets d'inhibiteurs sélectifs de PDE3 et PDE4 sur les niveaux d'AMPc subcellulaires enregistrés avec la sonde FRET H187 dans des cardiomyocytes ventriculaires de cochon.

La **Figure 2** représente les effets moyens des inhibiteurs des PDE3 et des PDE4 lors d'une stimulation β -AR avec 10 nM d'Iso avec ou sans inhibition de la CaMKII sur l'amplitude moyenne des transitoires Ca^{2+} , le raccourcissement des sarcomères et la fréquence d'apparition de VCS. L'inhibition des PDE3 comme celle des PDE4 provoque l'apparition de VCS pro-arythmiques lors d'une stimulation β -AR. La fréquence de survenue des VCS est fortement réduite par l'inhibition concomitante de la CaMKII. Néanmoins, nous pouvons remarquer une diminution non-significative de l'amplitude moyenne des transitoires Ca^{2+} qui s'accompagne d'une diminution significative de l'amplitude de la contraction cellulaire lorsque la CaMKII est inhibée par 10 μM de KN-93.

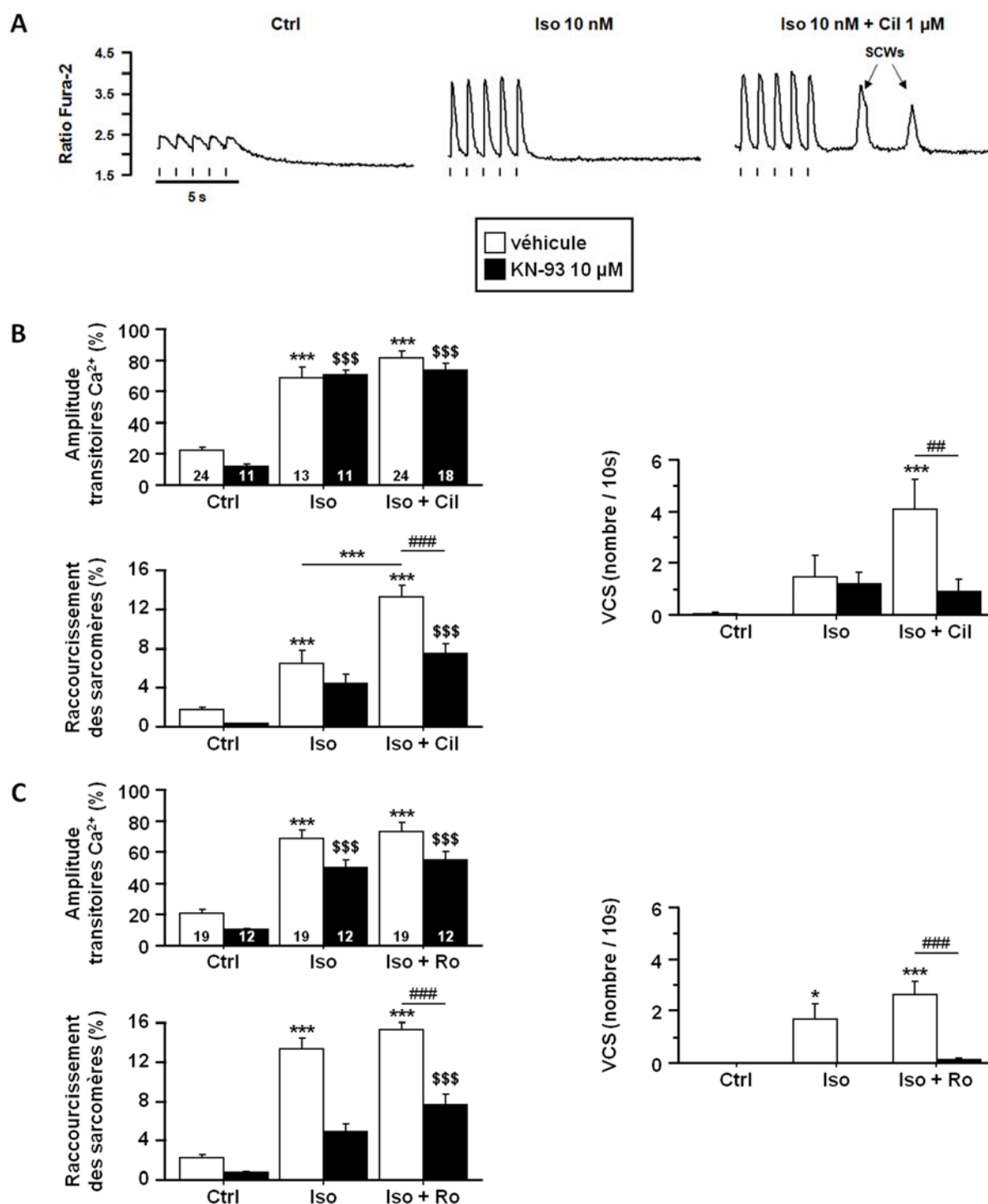


Figure 2 : Effets d'inhibiteurs sélectifs de PDE3 et PDE4 sur l'amplitude des transitoires Ca^{2+} , la contraction cellulaire et la fréquence d'apparition de VCS enregistrées dans des cardiomyocytes ventriculaires de cochon.

A : Exemple de tracé obtenu lors de l'enregistrement des transitoires Ca^{2+} et des VCS, **B :** Amplitude moyenne des transitoires Ca^{2+} et du raccourcissement des sarcomères, et fréquence d'apparition des vagues calciques (VCS) en présence d'un inhibiteur de PDE3 (Cil) avec ou sans inhibiteur de CaMKII (KN-93), **C :** Amplitude moyenne des transitoires Ca^{2+} et du raccourcissement des sarcomères, et fréquence d'apparition de VCS en présence d'un inhibiteur de PDE4 (Ro) avec ou sans inhibiteur de CaMKII (KN-93).

C. Conclusions

Les résultats des expériences réalisées chez le cochon montrent que les PDE3 et les PDE4 sont exprimées dans le cardiomyocyte ventriculaire de cochon et qu'elles y jouent un rôle dans la dégradation des signaux AMPc en conditions basales, mais aussi lors d'une stimulation β -AR. Mes résultats sont cohérents avec une étude réalisée sur des tissus ventriculaires porcins ayant montré l'importance des PDE4 puis des PDE3 dans la dégradation d'AMPc *in vitro* (Zimmermann et al. 1994). Lors d'une stimulation β -AR, l'inhibition des PDE3 ou des PDE4 provoque l'apparition de VCS témoignant d'une dérégulation de l'homéostasie Ca^{2+} . L'inhibition de la CaMKII réduit de manière très significative la fréquence des VCS observées, cependant, l'inhibiteur de CaMKII induit également une diminution significative de la contraction cellulaire associée à une tendance non-significative à la diminution de l'amplitude des transitoires Ca^{2+} . Cette dernière observation, qui diffère des résultats obtenus chez le rat, pourrait être due à un effet non-spécifique du KN-93. Parmi les effets non-spécifiques décrits, le KN-93 et le KN-92 exercent tous les deux des effets inhibiteurs sur un grand nombre de canaux K^+ dépendants du potentiel (Rezazadeh et al. 2006), mais aussi sur le LTCC à des degrés qui ne sont pas exactement identiques (Gao et al. 2006). Or, si l'inhibition des courants K^+ est plutôt pro-arythmique et peut donc être écartée des explications possibles d'un effet anti-arythmique du KN-93, cette propriété anticalcique pourrait pour sa part expliquer la diminution de la contraction ainsi que l'effet anti-arythmique observés (Anderson et al. 1998). Les expériences sur les myocytes de rat sont réalisées à 21°C tandis que celles sur les myocytes de cochon le sont à 30°C. Cette différence d'effet du KN-93 pourrait être due à l'influence de la température sur l'accessibilité du LTCC à l'inhibiteur. Limités par le faible nombre d'animaux disponibles, nous n'avons pas pu ajouter de condition expérimentale supplémentaire, en particulier comparer à l'effet du KN-92 comme j'ai pu le faire chez le rat, mais il serait néanmoins particulièrement intéressant de vérifier que l'effet observé sur la fréquence des VCS est entièrement dû à l'inhibition de la CaMKII et non à un effet anti-calcique. Ceci suggère la réalisation de nouvelles expériences en présence d'un autre inhibiteur plus sélectif pour la CaMKII qui n'influence pas l'activité du LTCC, tel l'AIP (Gao et al. 2006).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans les effets pro-arythmiques d'une inhibition des PDE4. Dans une première partie, j'ai participé à montrer le rôle prépondérant des PDE4 dans la dégradation des signaux AMPc lorsque les niveaux de ce second messenger sont augmentés soit par une inhibition d'autres PDE, et en particulier des PDE3 qui jouent un rôle majoritaire dans la régulation du CEC en conditions basales chez le rongeur, soit lors d'une stimulation β -AR (Mika et al. 2013). Si ce travail a porté sur l'étude des PDE2, PDE3 et PDE4, le rôle de la PDE1 n'a pas été étudié du fait de l'absence d'un inhibiteur spécifique. Or, depuis la publication de ce travail, un nouvel inhibiteur relativement sélectif a été produit par Pfizer : le PF-04471141 (Humphrey 2014). Une première perspective de ce travail serait d'étudier le rôle de la PDE1 dans le CEC cardiaque grâce à l'utilisation de ce composé. Cette perspective est actuellement développée au laboratoire par L. Zhang au cours de son doctorat.

Il est bien connu que la PDE3 joue un rôle majeur dans la dégradation de l'AMPc chez les gros mammifères tels que l'Homme et le chien (Weishaar et al. 1987 ; Lugnier et al. 1993 ; Smith et al. 1997 ; Richter et al. 2011 ; Molina et al. 2014). En ce sens, j'ai également montré qu'elle joue un rôle important dans le cœur de cochon, au même titre que la PDE4. Si les inhibiteurs de PDE ont un effet inotrope positif, leur emploi augmente les arythmies, phénomènes qui sont également observés dans des modèles génétiques où l'expression des PDE est diminuée (Packer et al. 1991 ; Lehnart et al. 2005 ; Leroy et al. 2011). Par l'enregistrement du potentiel de membrane de cardiomyocytes de rat par la technique de patch clamp et par la mesure des transitoires Ca^{2+} et de la contraction cellulaire, j'ai montré que ces arythmies sont dues à des DADs liées à des perturbations de l'homéostasie Ca^{2+} , qui se caractérisent par une fuite de Ca^{2+} liée à une surcharge en Ca^{2+} du RS. J'ai également montré que les effets inotrope et lusitrope positifs des inhibiteurs de PDE sont essentiellement liés à l'activité de la PKA, tandis que les effets pro-arythmiques sont liés à la fois à l'activation de la PKA et de la CaMKII.

Mes résultats confirment donc le rôle majeur de la PKA dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} , un fait important à rappeler au vu de la littérature récente qui a tendance à se concentrer principalement sur le rôle de la CaMKII (Pereira et al. 2013). Mes résultats montrent aussi que l'utilisation du H-89 à des concentrations inférieures à 10 μM ne permet

pas d'inhiber totalement la PKA dans nos conditions expérimentales. Ainsi, l'interprétation des résultats d'études où ces concentrations sont utilisées est à prendre avec précaution.

Il a cependant été montré que le H-89 à 10 μM inhibe la SERCA2a (Hussain et al. 1999), ce qui pourrait diminuer la charge en Ca^{2+} du RS et expliquer la suppression des effets inotrope positifs et pro-arythmiques des inhibiteurs de PDE indépendamment de PKA. De plus, ceci pourrait également masquer les effets inotropes et pro-arythmiques d'une activation d'Epac. Néanmoins, les résultats obtenus avec le PKI, un inhibiteur peptidique très spécifique de PKA (Lum et al. 1999), récapitulant les effets du H89, rendent peu probables ces deux hypothèses.

Mon travail de thèse a porté sur l'étude des effets d'une inhibition de l'ensemble des PDE4 par le Ro 20-1724. Or, comme nous l'avons mentionné en introduction, la famille des PDE4 regroupe plusieurs isoformes et trois gènes sont exprimés au niveau cardiaque (Kostic et al. 1997). Une autre perspective de ce travail serait de préciser le rôle des différentes isoformes de PDE4 dans les vagues calciques et les DADs, en mettant à profit les souris *PDE4B*^{-/-} et *PDE4D*^{-/-} dont nous disposons au laboratoire. L'inhibition de l'ensemble des PDE4 provoque les effets délétères décrits dans ma thèse, qu'en est-il au niveau de chacune des isoformes de PDE4 exprimées dans le cardiomyocyte ? Peut-on imaginer des voies de signalisation différentes contrôlant l'activité des cibles régulées par la PDE4B d'une part (le LTCC qui joue un rôle dans la surcharge Ca^{2+} cellulaire) et par la PDE4D d'autre part (le RyR2 qui contrôle la fuite de Ca^{2+} du RS) ? Par ailleurs, il est étonnant de constater que le rôle de l'isoforme PDE4A reste inconnu, bien qu'elle soit exprimée dans le cœur (Leroy et al. 2011).

L'ensemble de mes résultats a été obtenu à une fréquence de stimulation de 1 Hz. Etant donné que l'activité de la CaMKII est augmentée avec la fréquence de stimulation, il aurait été intéressant d'évaluer la contribution respective de la PKA et de la CaMKII à des fréquences plus élevées et plus proches de la fréquence cardiaque du rat.

Il serait aussi particulièrement intéressant d'étudier ces mécanismes pro-arythmiques dans des modèles pathologiques. Cette étude pourrait ainsi être réalisée dans des cardiomyocytes isolés de cœurs hypertrophiés ou insuffisants, issus d'animaux ayant subi par exemple une constriction de l'aorte transverse, ou traités de manière chronique avec un agoniste β -AR grâce à l'implant de mini-pompes diffusant de l'isoprénaline dans la circulation sanguine. L'utilisation de tels modèles pathologiques pourrait notamment permettre de

démasquer un rôle plus important d'Epac et de la CaMKII dans la régulation du CEC puisque leur expression est augmentée dans ces modèles comme montré dans la littérature (Metrich et al. 2008 ; Said et al. 2002 ; Zhao et al. 2004 ; Ruiz-Hurtado et al. 2012).

Il est particulièrement intéressant de constater que si l'inhibition de la CaMKII n'atténue pas l'effet inotrope positif d'une stimulation β -AR et préserve la charge en Ca^{2+} du RS et l'amplitude des transitoires Ca^{2+} , elle permet de diminuer fortement la fuite de Ca^{2+} du RS et, par conséquent, la surcharge en Ca^{2+} du cytoplasme à l'origine des DADs pro-arythmiques. Les inhibiteurs de PDE, par leur effet inotrope positif, sont utilisés en tant que traitement de dernier recours de l'IC aiguë ainsi que dans le traitement pré-greffe et post-greffe pour stimuler la fonction cardiaque (Assad-Kottner et al. 2008). Ces traitements sont cependant limités à de courtes durées car les inhibiteurs tels que la milrinone provoquent un risque de développement d'arythmies (Packer et al. 1991). Les résultats obtenus nous permettent donc de suggérer, à terme, l'utilisation d'un inhibiteur de PDE en association avec un inhibiteur de CaMKII dans le traitement de l'IC aiguë chez l'Homme.

Pourrait-on envisager que cette combinaison aurait aussi des conséquences bénéfiques dans l'IC chronique ? La littérature montre qu'une sur-activation de la voie β -AR provoque des effets délétères en entraînant une diminution de l'expression des PDE3A associée à de l'apoptose (Ding et al. 2005). De façon intéressante, l'inhibition de CaMKII prévient l'apoptose induite par stimulation β -AR (Zhu et al. 2003). Ces données suggèrent donc qu'une inhibition de la CaMKII pourrait limiter non seulement les effets pro-arythmiques mais aussi pro-apoptotiques des inhibiteurs de PDE3.

Dans l'IC chronique, les β -bloquants ont prouvé leur efficacité. Dès lors, une stratégie thérapeutique opposée pourrait consister à limiter l'activation de la CaMKII et protéger des arythmies et de l'apoptose en activant les PDE. Cette stratégie est en cours d'étude au sein de notre équipe en utilisant des modèles de souris transgéniques surexprimant des PDE au niveau cardiaque et le développement de vecteurs AAV9 (virus adéno-associés de sérotype 9). Personnellement, je poursuivrai ce travail par une étude destinée à caractériser les effets d'activateurs de la PDE4B dans le cardiomyocyte ventriculaire de rat dans le cadre du projet LERMIT TREAT-HF, afin d'en évaluer les possibles effets anti-hypertrophiques et anti-arythmiques.

En conclusion, les résultats des études menées pendant ma thèse présentent donc la CaMKII comme un acteur des voies de signalisation impliquées dans la perturbation de l'homéostasie Ca^{2+} pro-arythmique observée dans des modèles animaux sains soumis à une inhibition des PDE3 ou des PDE4 concomitante d'une stimulation β -AR. Ces résultats suggèrent l'utilisation d'inhibiteurs de la CaMKII en complément des inhibiteurs de PDE dans le traitement de pathologies cardiaques permettant de préserver les effets cardio-stimulants des inhibiteurs de PDE tout en s'affranchissant de leurs effets pro-arythmiques. Ces résultats nécessitent d'être validés, notamment dans des modèles pathologiques, mais ils constituent, dans la quête de traitements performants affectant le moins possible la qualité de vie des patients, un sérieux motif d'espoir.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abi-Gerges, A., W. Richter, F. Lefebvre, P. Mateo, A. Varin, C. Heymes, J. L. Samuel, C. Lugnier, M. Conti, R. Fischmeister and G. Vandecasteele (2009). "Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals." *Circ Res* **105**(8): 784-792.

Abiria, S. A. and R. J. Colbran (2010). "CaMKII associates with CaV1.2 L-type calcium channels via selected beta subunits to enhance regulatory phosphorylation." *J Neurochem* **112**(1): 150-161.

Ahmad, F., W. Shen, F. Vandeput, N. Szabo-Fresnais, J. Krall, E. Degerman, F. Goetz, E. Klusmann, M. Movsesian and V. Manganiello (2015). "Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity by phosphodiesterase 3A (PDE3A) in human myocardium: phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2." *J Biol Chem* **290**(11): 6763-6776.

Ai, X., J. W. Curran, T. R. Shannon, D. M. Bers and S. M. Pogwizd (2005). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure." *Circ Res* **97**(12): 1314-1322.

Alcalay, Y., E. Hochhauser, V. Kliminski, J. Dick, M. A. Zahalka, D. Parnes, H. Schlesinger, Z. Abassi, A. Shainberg, R. F. Schindler, T. Brand and G. Kessler-Icekson (2013). "Popeye domain containing 1 (Popdc1/Bves) is a caveolae-associated protein involved in ischemia tolerance." *PLoS One* **8**(9): e71100.

Allen, D. G., B. R. Jewell and J. W. Murray (1974). "The contribution of activation processes to the length-tension relation of cardiac muscle." *Nature* **248**(449): 606-607.

Allen, M. D. and J. Zhang (2006). "Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters." *Biochem Biophys Res Commun* **348**(2): 716-721.

Almahariq, M., F. C. Mei and X. Cheng (2014). "Cyclic AMP sensor EPAC proteins and energy homeostasis." *Trends Endocrinol Metab* **25**(2): 60-71.

Anderson, M. E., A. P. Braun, H. Schulman and B. A. Premack (1994). "Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca²⁺-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes." *Circ Res* **75**(5): 854-861.

Anderson, M. E., A. P. Braun, Y. Wu, T. Lu, Y. Wu, H. Schulman and R. J. Sung (1998). "KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart." *J Pharmacol Exp Ther* **287**(3): 996-1006.

Andrade, A., A. Sandoval, N. Oviedo, M. De Waard, D. Elias and R. Felix (2007). "Proteolytic cleavage of the voltage-gated Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ subunit: structural and functional features." *Eur J Neurosci* **25**(6): 1705-1710.

Antonio, R. L., O. E. Brodde, D. J. van Veldhuisen, E. Scholtens, H. J. Crijns and W. H. van Gilst (2000). "Beta-adrenoceptor density in chronic infarcted myocardium: a subtype specific decrease of beta1-adrenoceptor density." Int J Cardiol **72**(2): 137-141.

Argibay, J. A., R. Fischmeister and H. C. Hartzell (1988). "Inactivation, reactivation and pacing dependence of calcium current in frog cardiocytes: correlation with current density." J Physiol **401**: 201-226.

Assad-Kottner, C., D. Chen, J. Jahanyar, F. Cordova, N. Summers, M. Loebe, R. Merla, K. Youker and G. Torre-Amione (2008). "The use of continuous milrinone therapy as bridge to transplant is safe in patients with short waiting times." J Card Fail **14**(10): 839-843.

Babu, G. J., P. Bhupathy, C. A. Carnes, G. E. Billman and M. Periasamy (2007). "Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology." J Mol Cell Cardiol **43**(2): 215-222.

Babu, G. J., Z. Zheng, P. Natarajan, D. Wheeler, P. M. Janssen and M. Periasamy (2005). "Overexpression of sarcolipin decreases myocyte contractility and calcium transient." Cardiovasc Res **65**(1): 177-186.

Backs, J., T. Backs, S. Bezprozvannaya, T. A. McKinsey and E. N. Olson (2008). "Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4." Mol Cell Biol **28**(10): 3437-3445.

Backs, J., K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang and E. N. Olson (2006). "CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy." J Clin Invest **116**(7): 1853-1864.

Backs, J., B. C. Worst, L. H. Lehmann, D. M. Patrick, Z. Jebessa, M. M. Kreusser, Q. Sun, L. Chen, C. Heft, H. A. Katus and E. N. Olson (2011). "Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4." J Cell Biol **195**(3): 403-415.

Baillie, G. S., A. Sood, I. McPhee, I. Gall, S. J. Perry, R. J. Lefkowitz and M. D. Houslay (2003). "beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 940-945.

Balijepalli, R. C., J. D. Foell, D. D. Hall, J. W. Hell and T. J. Kamp (2006). "Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(19): 7500-7505.

Ballard, C. and S. Schaffer (1996). "Stimulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger by phenylephrine, angiotensin II and endothelin 1." J Mol Cell Cardiol **28**(1): 11-17.

Balshaw, D., L. Gao and G. Meissner (1999). "Luminal loop of the ryanodine receptor: a pore-forming segment?" Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3345-3347.

Balshaw, D. M., L. Xu, N. Yamaguchi, D. A. Pasek and G. Meissner (2001). "Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor)." J Biol Chem **276**(23): 20144-20153.

Baltas, L. G., P. Karczewski, S. Bartel and E. G. Krause (1997). "The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase is activated in response to beta-adrenergic stimulation and becomes Ca^{2+} -independent in intact beating hearts." *FEBS Lett* **409**(2): 131-136.

Bangalore, R., G. Mehrke, K. Gingrich, F. Hofmann and R. S. Kass (1996). "Influence of L-type Ca channel $\alpha 2/\delta$ -subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells." *Am J Physiol* **270**(5 Pt 2): H1521-1528.

Bare, D. J., C. S. Kettlun, M. Liang, D. M. Bers and G. A. Mignery (2005). "Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Biol Chem* **280**(16): 15912-15920.

Barefield, D. and S. Sadayappan (2010). "Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease." *J Mol Cell Cardiol* **48**(5): 866-875.

Baruscotti, M., A. Bucchi and D. DiFrancesco (2005). "Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current." *Pharmacol Ther* **107**(1): 59-79.

Baughman, J. M., F. Perocchi, H. S. Girgis, M. Plovanich, C. A. Belcher-Timme, Y. Sancak, X. R. Bao, L. Strittmatter, O. Goldberger, R. L. Bogorad, V. Koteliansky and V. K. Mootha (2011). "Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter." *Nature* **476**(7360): 341-345.

Bauman, A. L., J. Soughayer, B. T. Nguyen, D. Willoughby, G. K. Carnegie, W. Wong, N. Hoshi, L. K. Langeberg, D. M. Cooper, C. W. Dessauer and J. D. Scott (2006). "Dynamic regulation of cAMP synthesis through anchored PKA-adenylyl cyclase V/VI complexes." *Mol Cell* **23**(6): 925-931.

Beard, M. B., A. E. Olsen, R. E. Jones, S. Erdogan, M. D. Houslay and G. B. Bolger (2000). "UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions." *J Biol Chem* **275**(14): 10349-10358.

Beavo, J. A., J. G. Hardman and E. W. Sutherland (1971). "Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5'-monophosphate." *J Biol Chem* **246**(12): 3841-3846.

Beazely, M. A. and V. J. Watts (2006). "Regulatory properties of adenylyl cyclases type 5 and 6: A progress report." *Eur J Pharmacol* **535**(1-3): 1-12.

Beca, S., F. Ahmad, W. Shen, J. Liu, S. Makary, N. Polidovitch, J. Sun, S. Hockman, Y. W. Chung, M. Movsesian, E. Murphy, V. Manganiello and P. H. Backx (2013). "Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2a signaling complexes in mouse heart." *Circ Res* **112**(2): 289-297.

Belge, C., J. Hammond, E. Dubois-Deruy, B. Manoury, J. Hamelet, C. Beauloye, A. Markl, A. C. Pouleur, L. Bertrand, H. Esfahani, K. Jnaoui, K. R. Gotz, V. O. Nikolaev, A. Vanderper, P. Herijgers, I. Lobysheva, G. Iaccarino, D. Hilfiker-Kleiner, G. Tavernier, D. Langin, C. Dessy and J. L. Balligand (2014). "Enhanced expression of beta3-adrenoceptors in cardiac

myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase." Circulation **129**(4): 451-462.

Bender, A. T. and J. A. Beavo (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." Pharmacol Rev **58**(3): 488-520.

Benitah, J. P., J. L. Alvarez and A. M. Gomez (2010). "L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 26-36.

Benkusky, N. A., C. S. Weber, J. A. Scherman, E. F. Farrell, T. A. Hacker, M. C. John, P. A. Powers and H. H. Valdivia (2007). "Intact beta-adrenergic response and unmodified progression toward heart failure in mice with genetic ablation of a major protein kinase A phosphorylation site in the cardiac ryanodine receptor." Circ Res **101**(8): 819-829.

Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.

Bers, D. M. (1997). "Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle." Basic Res Cardiol **92 Suppl 1**: 1-10.

Bers, D. M. (2001). Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht ; Boston, Kluwer Academic Publishers.

Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.

Bers, D. M. (2014). "Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction." Annu Rev Physiol **76**: 107-127.

Bers, D. M. and E. Grandi (2009). "Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels." J Cardiovasc Pharmacol **54**(3): 180-187.

Bers, D. M. and S. Morotti (2014). "Ca(2+) current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences." Front Pharmacol **5**: 144.

Bers, D. M. and V. M. Stiffel (1993). "Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling." Am J Physiol **264**(6 Pt 1): C1587-1593.

Berthouze-Duquesnes, M., A. Lucas, A. Sauliere, Y. Y. Sin, A. C. Laurent, C. Gales, G. Baillie and F. Lezoualc'h (2013). "Specific interactions between Epac1, beta-arrestin2 and PDE4D5 regulate beta-adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling." Cell Signal **25**(4): 970-980.

Bethke, T., T. Eschenhagen, A. Klimkiewicz, C. Kohl, H. von der Leyen, H. Mehl, U. Mende, W. Meyer, J. Neumann, S. Rosswag and et al. (1992). "Phosphodiesterase inhibition by enoximone in preparations from nonfailing and failing human hearts." Arzneimittelforschung **42**(4): 437-445.

Bezprozvanny, I., J. Watras and B. E. Ehrlich (1991). "Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum." Nature **351**(6329): 751-754.

Bisserier, M., J. P. Blondeau and F. Lezoualc'h (2014). "Epac proteins: specific ligands and role in cardiac remodelling." Biochem Soc Trans **42**(2): 257-264.

Blayney, L. M., J. L. Jones, J. Griffiths and F. A. Lai (2010). "A mechanism of ryanodine receptor modulation by FKBP12/12.6, protein kinase A, and K201." Cardiovasc Res **85**(1): 68-78.

Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." EMBO J **18**(7): 1723-1729.

Bois, P., B. Renaudon, M. Baruscotti, J. Lenfant and D. DiFrancesco (1997). "Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes." J Physiol **501** (Pt 3): 565-571.

Bolger, G., T. Michaeli, T. Martins, T. St John, B. Steiner, L. Rodgers, M. Riggs, M. Wigler and K. Ferguson (1993). "A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs." Mol Cell Biol **13**(10): 6558-6571.

Bond, R. A. and R. J. Lefkowitz (1996). "The third beta is not the charm." J Clin Invest **98**(2): 241.

Boyman, L., A. C. Chikando, G. S. Williams, R. J. Khairallah, S. Kettlewell, C. W. Ward, G. L. Smith, J. P. Kao and W. J. Lederer (2014). "Calcium movement in cardiac mitochondria." Biophys J **107**(6): 1289-1301.

Bradshaw, J. M., Y. Kubota, T. Meyer and H. Schulman (2003). "An ultrasensitive Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-protein phosphatase 1 switch facilitates specificity in postsynaptic calcium signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10512-10517.

Brandmayr, J., M. Poomvanicha, K. Domes, J. Ding, A. Blaich, J. W. Wegener, S. Moosmang and F. Hofmann (2012). "Deletion of the C-terminal phosphorylation sites in the cardiac beta-subunit does not affect the basic beta-adrenergic response of the heart and the Ca(v)1.2 channel." J Biol Chem **287**(27): 22584-22592.

Breckler, M., M. Berthouze, A. C. Laurent, B. Crozatier, E. Morel and F. Lezoualc'h (2011). "Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications." Cell Signal **23**(8): 1257-1266.

Brette, F., J. Leroy, J. Y. Le Guennec and L. Salle (2006). "Ca²⁺ currents in cardiac myocytes: Old story, new insights." Prog Biophys Mol Biol **91**(1-2): 1-82.

Brillantes, A. B., K. Ondrias, A. Scott, E. Kobrinsky, E. Ondriasova, M. C. Moschella, T. Jayaraman, M. Landers, B. E. Ehrlich and A. R. Marks (1994). "Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein." Cell **77**(4): 513-523.

Bristow, M. R., R. Ginsburg, V. Umans, M. Fowler, W. Minobe, R. Rasmussen, P. Zera, R. Menlove, P. Shah, S. Jamieson and et al. (1986). "Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure." Circ Res **59**(3): 297-309.

Brodde, O. E. (1996). "Beta-adrenergic receptors in failing human myocardium." Basic Res Cardiol **91 Suppl 2**: 35-40.

Brookes, P. S., Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders and S. S. Sheu (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(4): C817-833.

Broussard, J. A., B. Rappaz, D. J. Webb and C. M. Brown (2013). "Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt." Nat Protoc **8**(2): 265-281.

Buck, E., I. Zimanyi, J. J. Abramson and I. N. Pessah (1992). "Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel." J Biol Chem **267**(33): 23560-23567.

Bunemann, M., B. L. Gerhardstein, T. Gao and M. M. Hosey (1999). "Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit." J Biol Chem **274**(48): 33851-33854.

Buraei, Z. and J. Yang (2010). "The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels." Physiol Rev **90**(4): 1461-1506.

Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni and H. E. Hamm (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." Endocr Rev **24**(6): 765-781.

Camors, E. and H. H. Valdivia (2014). "CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors." Front Pharmacol **5**: 101.

Carlisle Michel, J. J., K. L. Dodge, W. Wong, N. C. Mayer, L. K. Langeberg and J. D. Scott (2004). "PKA-phosphorylation of PDE4D3 facilitates recruitment of the mAKAP signalling complex." Biochem J **381**(Pt 3): 587-592.

Castro, L. R., I. Verde, D. M. Cooper and R. Fischmeister (2006). "Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes." Circulation **113**(18): 2221-2228.

Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-555.

Catterall, W. A. and T. M. Swanson (2015). "Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels." Mol Pharmacol.

Cazorla, O., A. Lucas, F. Poirier, A. Lacampagne and F. Lezoualc'h (2009). "The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14144-14149.

Chalovich, J. M. and E. Eisenberg (1982). "Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin." J Biol Chem **257**(5): 2432-2437.

Chang, F., I. S. Cohen, D. DiFrancesco, M. R. Rosen and C. Tromba (1991). "Effects of protein kinase inhibitors on canine Purkinje fibre pacemaker depolarization and the pacemaker current $i(f)$." J Physiol **440**: 367-384.

Chao, L. H., P. Pellicena, S. Deindl, L. A. Barclay, H. Schulman and J. Kuriyan (2010). "Intersubunit capture of regulatory segments is a component of cooperative CaMKII activation." Nat Struct Mol Biol **17**(3): 264-272.

Charpentier, F., J. Merot, G. Loussouarn and I. Baro (2010). "Delayed rectifier $K(+)$ currents and cardiac repolarization." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 37-44.

Chase, A. and C. H. Orchard (2011). "Ca efflux via the sarcolemmal Ca ATPase occurs only in the t-tubules of rat ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **50**(1): 187-193.

Cheepala, S., J. S. Hulot, J. A. Morgan, Y. Sassi, W. Zhang, A. P. Naren and J. D. Schuetz (2013). "Cyclic nucleotide compartmentalization: contributions of phosphodiesterases and ATP-binding cassette transporters." Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 231-253.

Chelu, M. G., S. Sarma, S. Sood, S. Wang, R. J. van Oort, D. G. Skapura, N. Li, M. Santonastasi, F. U. Muller, W. Schmitz, U. Schotten, M. E. Anderson, M. Valderrabano, D. Dobrev and X. H. Wehrens (2009). "Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak promotes atrial fibrillation in mice." J Clin Invest **119**(7): 1940-1951.

Chen, J., L. R. Levin and J. Buck (2012). "Role of soluble adenylyl cyclase in the heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **302**(3): H538-543.

Chen, Y., A. Harry, J. Li, M. J. Smit, X. Bai, R. Magnusson, J. P. Pieroni, G. Weng and R. Iyengar (1997). "Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 14100-14104.

Cheng, H., W. J. Lederer and M. B. Cannell (1993). "Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle." Science **262**(5134): 740-744.

Cheung, W. Y. (1970). "Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator." Biochem Biophys Res Commun **38**(3): 533-538.

Chien, A. J., T. Gao, E. Perez-Reyes and M. M. Hosey (1998). "Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the beta2a subunit." J Biol Chem **273**(36): 23590-23597.

Chopra, N. and B. C. Knollmann (2009). "Cardiac calsequestrin: the new kid on the block in arrhythmias." J Cardiovasc Electrophysiol **20**(10): 1179-1185.

Chu, G. and E. G. Kranias (2002). "Functional interplay between dual site phospholamban phosphorylation: insights from genetically altered mouse models." Basic Res Cardiol **97 Suppl 1**: I43-48.

Chu, G., J. W. Lester, K. B. Young, W. Luo, J. Zhai and E. G. Kranias (2000). "A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta -agonists." J Biol Chem **275**(49): 38938-38943.

Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-1654.

Communal, C., K. Singh, D. B. Sawyer and W. S. Colucci (1999). "Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein." Circulation **100**(22): 2210-2212.

Cong, M., S. J. Perry, F. T. Lin, I. D. Fraser, L. A. Hu, W. Chen, J. A. Pitcher, J. D. Scott and R. J. Lefkowitz (2001). "Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79." J Biol Chem **276**(18): 15192-15199.

Conti, M. and J. Beavo (2007). "Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling." Annu Rev Biochem **76**: 481-511.

Corbin, J. D. and S. L. Keely (1977). "Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes." J Biol Chem **252**(3): 910-918.

Corbin, J. D., S. L. Keely and C. R. Park (1975). "The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues." J Biol Chem **250**(1): 218-225.

Corbin, J. D., P. H. Sugden, T. M. Lincoln and S. L. Keely (1977). "Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue." J Biol Chem **252**(11): 3854-3861.

Craig, R., K. H. Lee, J. Y. Mun, I. Torre and P. K. Luther (2014). "Structure, sarcomeric organization, and thin filament binding of cardiac myosin-binding protein-C." Pflugers Arch **466**(3): 425-431.

Curran, J., K. H. Brown, D. J. Santiago, S. Pogwizd, D. M. Bers and T. R. Shannon (2010). "Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II." J Mol Cell Cardiol **49**(1): 25-32.

Davoren, P. R. and E. W. Sutherland (1963). "The Effect of L-Epinephrine and Other Agents on the Synthesis and Release of Adenosine 3',5'-Phosphate by Whole Pigeon Erythrocytes." J Biol Chem **238**: 3009-3015.

Dazert, P., K. Meissner, S. Vogelgesang, B. Heydrich, L. Eckel, M. Bohm, R. Warzok, R. Kerb, U. Brinkmann, E. Schaeffeler, M. Schwab, I. Cascorbi, G. Jedlitschky and H. K. Kroemer (2003). "Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart." Am J Pathol **163**(4): 1567-1577.

De Arcangelis, V., R. Liu, D. Soto and Y. Xiang (2009). "Differential association of phosphodiesterase 4D isoforms with beta2-adrenoceptor in cardiac myocytes." J Biol Chem **284**(49): 33824-33832.

De Jongh, K. S., B. J. Murphy, A. A. Colvin, J. W. Hell, M. Takahashi and W. A. Catterall (1996). "Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase." Biochemistry **35**(32): 10392-10402.

de Rooij, J., H. Rehmann, M. van Triest, R. H. Cool, A. Wittinghofer and J. L. Bos (2000). "Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs." J Biol Chem **275**(27): 20829-20836.

de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer and J. L. Bos (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." Nature **396**(6710): 474-477.

De Stefani, D., A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabo and R. Rizzuto (2011). "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter." Nature **476**(7360): 336-340.

De Stefani, D. and R. Rizzuto (2014). "Molecular control of mitochondrial calcium uptake." Biochem Biophys Res Commun **449**(4): 373-376.

de Tombe, P. P. (2003). "Cardiac myofilaments: mechanics and regulation." J Biomech **36**(5): 721-730.

De Waard, M., V. E. Scott, M. Pragnell and K. P. Campbell (1996). "Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca²⁺ channels." FEBS Lett **380**(3): 272-276.

Deck, K. A. and W. Trautwein (1964). "Ionic Currents in Cardiac Excitation." Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere **280**: 63-80.

Di Benedetto, G., E. Scalzotto, M. Mongillo and T. Pozzan (2013). "Mitochondrial Ca²⁺(+) uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels." Cell Metab **17**(6): 965-975.

DiFrancesco, D. and P. Tortora (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." Nature **351**(6322): 145-147.

Ding, B., J. Abe, H. Wei, Q. Huang, R. A. Walsh, C. A. Molina, A. Zhao, J. Sadoshima, B. C. Blaxall, B. C. Berk and C. Yan (2005). "Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure." Circulation **111**(19): 2469-2476.

Ding, B., J. Abe, H. Wei, H. Xu, W. Che, T. Aizawa, W. Liu, C. A. Molina, J. Sadoshima, B. C. Blaxall, B. C. Berk and C. Yan (2005). "A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14771-14776.

Dittrich, M., J. Jurevicius, M. Georget, F. Rochais, B. Fleischmann, J. Hescheler and R. Fischmeister (2001). "Local response of L-type Ca(2+) current to nitric oxide in frog ventricular myocytes." J Physiol **534**(Pt 1): 109-121.

Diviani, D., K. L. Dodge-Kafka, J. Li and M. S. Kapiloff (2011). "A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(5): H1742-1753.

Dobson, J. G., Jr., J. Fray, J. L. Leonard and R. E. Pratt (2003). "Molecular mechanisms of reduced beta-adrenergic signaling in the aged heart as revealed by genomic profiling." Physiol Genomics **15**(2): 142-147.

Dodge-Kafka, K. L., L. Langeberg and J. D. Scott (2006). "Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins." Circ Res **98**(8): 993-1001.

Dodge-Kafka, K. L., J. Soughayer, G. C. Pare, J. J. Carlisle Michel, L. K. Langeberg, M. S. Kapiloff and J. D. Scott (2005). "The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways." Nature **437**(7058): 574-578.

Dodge, K. L., S. Khouangsathiene, M. S. Kapiloff, R. Mouton, E. V. Hill, M. D. Houslay, L. K. Langeberg and J. D. Scott (2001). "mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module." EMBO J **20**(8): 1921-1930.

Dostmann, W. R. and S. S. Taylor (1991). "Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I." Biochemistry **30**(35): 8710-8716.

Dries, E., V. Bito, I. Lenaerts, G. Antoons, K. R. Sipido and N. Macquaide (2013). "Selective modulation of coupled ryanodine receptors during microdomain activation of calcium/calmodulin-dependent kinase II in the dyadic cleft." Circ Res **113**(11): 1242-1252.

Duquesnes, N., M. Derangeon, M. Metrich, A. Lucas, P. Mateo, L. Li, E. Morel, F. Lezoualc'h and B. Crozatier (2010). "Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect." Pflugers Arch **460**(4): 731-741.

Edman, C. F. and H. Schulman (1994). "Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms." Biochim Biophys Acta **1221**(1): 89-101.

Eisner, D. A., T. Kashimura, S. C. O'Neill, L. A. Venetucci and A. W. Trafford (2009). "What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis?" J Mol Cell Cardiol **46**(4): 474-481.

El Chemaly, A., C. Magaud, S. Patri, C. Jayle, R. Guinamard and P. Bois (2007). "The heart rate-lowering agent ivabradine inhibits the pacemaker current $I(f)$ in human atrial myocytes." J Cardiovasc Electrophysiol **18**(11): 1190-1196.

Ellinor, P. T., J. Yang, W. A. Sather, J. F. Zhang and R. W. Tsien (1995). "Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions." Neuron **15**(5): 1121-1132.

Emorine, L. J., S. Marullo, M. M. Briend-Sutren, G. Patey, K. Tate, C. Delavier-Klutcho and A. D. Strosberg (1989). "Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor." Science **245**(4922): 1118-1121.

Erickson, J. R., B. J. He, I. M. Grumbach and M. E. Anderson (2011). "CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states." Physiol Rev **91**(3): 889-915.

Erickson, J. R., M. L. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C. V. Oddis, R. K. Bartlett, J. S. Lowe, S. E. O'Donnell, N. Aykin-Burns, M. C. Zimmerman, K. Zimmerman, A. J. Ham, R. M. Weiss, D. R. Spitz, M. A. Shea, R. J. Colbran, P. J. Mohler and M. E. Anderson (2008). "A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation." Cell **133**(3): 462-474.

Erickson, J. R., L. Pereira, L. Wang, G. Han, A. Ferguson, K. Dao, R. J. Copeland, F. Despa, G. W. Hart, C. M. Ripplinger and D. M. Bers (2013). "Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation." Nature **502**(7471): 372-376.

Erneux, C., D. Couchie, J. E. Dumont, J. Baraniak, W. J. Stec, E. G. Abbad, G. Petridis and B. Jastorff (1981). "Specificity of cyclic GMP activation of a multi-substrate cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat liver." Eur J Biochem **115**(3): 503-510.

Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien and W. A. Catterall (2000). "Nomenclature of voltage-gated calcium channels." Neuron **25**(3): 533-535.

Eschenhagen, T. (2010). "Is ryanodine receptor phosphorylation key to the fight or flight response and heart failure?" J Clin Invest **120**(12): 4197-4203.

Espinasse, I., V. Iourgenko, N. Defer, F. Samson, J. Hanoune and J. J. Mercadier (1995). "Type V, but not type VI, adenylyl cyclase mRNA accumulates in the rat heart during ontogenic development. Correlation with increased global adenylyl cyclase activity." J Mol Cell Cardiol **27**(9): 1789-1795.

Fabiato, A. and F. Fabiato (1977). "Calcium release from the sarcoplasmic reticulum." Circ Res **40**(2): 119-129.

Fabiato, A. and F. Fabiato (1978). "Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles." Ann N Y Acad Sci **307**: 491-522.

Falchetto, R., T. Vorherr, J. Brunner and E. Carafoli (1991). "The plasma membrane Ca²⁺ pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain." J Biol Chem **266**(5): 2930-2936.

Falchetto, R., T. Vorherr and E. Carafoli (1992). "The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme." Protein Sci **1**(12): 1613-1621.

Farrell, E. F., A. Antaramian, A. Rueda, A. M. Gomez and H. H. Valdivia (2003). "Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart." J Biol Chem **278**(36): 34660-34666.

Fauconnier, J., S. Bedut, J. Y. Le Guennec, D. Babuty and S. Richard (2003). " Ca^{2+} current-mediated regulation of action potential by pacing rate in rat ventricular myocytes." Cardiovasc Res **57**(3): 670-680.

Fawcett, D. W. and N. S. McNutt (1969). "The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle." J Cell Biol **42**(1): 1-45.

Feldman, M. D., L. Copelas, J. K. Gwathmey, P. Phillips, S. E. Warren, F. J. Schoen, W. Grossman and J. P. Morgan (1987). "Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure." Circulation **75**(2): 331-339.

Ferrantini, C., C. Crocini, R. Coppini, F. Vanzi, C. Tesi, E. Cerbai, C. Poggesi, F. S. Pavone and L. Sacconi (2013). "The transverse-axial tubular system of cardiomyocytes." Cell Mol Life Sci **70**(24): 4695-4710.

Fill, M. and J. A. Copello (2002). "Ryanodine receptor calcium release channels." Physiol Rev **82**(4): 893-922.

Fischer, T. H., J. Eiringhaus, N. Dybkova, A. Forster, J. Herting, A. Kleinwachter, S. Ljubojevic, J. D. Schmitto, K. Streckfuss-Bomeke, A. Renner, J. Gummert, G. Hasenfuss, L. S. Maier and S. Sossalla (2014). " Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy." Eur J Heart Fail **16**(12): 1292-1300.

Fischer, T. H., J. Herting, T. Tirilomis, A. Renner, S. Neef, K. Toischer, D. Ellenberger, A. Forster, J. D. Schmitto, J. Gummert, F. A. Schondube, G. Hasenfuss, L. S. Maier and S. Sossalla (2013). " Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in human cardiac pathology." Circulation **128**(9): 970-981.

Fischmeister, R., L. Castro, A. Abi-Gerges, F. Rochais and G. Vandecasteele (2005). "Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **142**(2): 136-143.

Fischmeister, R., L. R. Castro, A. Abi-Gerges, F. Rochais, J. Jurevicius, J. Leroy and G. Vandecasteele (2006). "Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases." Circ Res **99**(8): 816-828.

Francis, S. H. and J. D. Corbin (1994). "Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases." Annu Rev Physiol **56**: 237-272.

Fraser, I. D., S. J. Tavalin, L. B. Lester, L. K. Langeberg, A. M. Westphal, R. A. Dean, N. V. Marrion and J. D. Scott (1998). "A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events." EMBO J **17**(8): 2261-2272.

Frielle, T., S. Collins, K. W. Daniel, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and B. K. Kobilka (1987). "Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(22): 7920-7924.

Froese, A., S. S. Breher, C. Waldeyer, R. F. Schindler, V. O. Nikolaev, S. Rinne, E. Wischmeyer, J. Schlueter, J. Becher, S. Simrick, F. Vauti, J. Kuhtz, P. Meister, S. Kreissl, A. Torlopp, S. K. Liebig, S. Laakmann, T. D. Muller, J. Neumann, J. Stieber, A. Ludwig, S. K. Maier, N. Decher, H. H. Arnold, P. Kirchhof, L. Fabritz and T. Brand (2012). "Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice." J Clin Invest **122**(3): 1119-1130.

Fu, Q., S. Kim, D. Soto, V. De Arcangelis, L. DiPilato, S. Liu, B. Xu, Q. Shi, J. Zhang and Y. K. Xiang (2014). "A long lasting beta1 adrenergic receptor stimulation of cAMP/protein kinase A (PKA) signal in cardiac myocytes." J Biol Chem **289**(21): 14771-14781.

Fu, Y., R. E. Westenbroek, T. Scheuer and W. A. Catterall (2014). "Basal and beta-adrenergic regulation of the cardiac calcium channel CaV1.2 requires phosphorylation of serine 1700." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(46): 16598-16603.

Fuller-Bicer, G. A., G. Varadi, S. E. Koch, M. Ishii, I. Bodi, N. Kadeer, J. N. Muth, G. Mikala, N. N. Petrashevskaya, M. A. Jordan, S. P. Zhang, N. Qin, C. M. Flores, I. Isaacsohn, M. Varadi, Y. Mori, W. K. Jones and A. Schwartz (2009). "Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel alpha2/delta-1-subunit." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(1): H117-124.

Fuller, M. D., M. A. Emrick, M. Sadilek, T. Scheuer and W. A. Catterall (2010). "Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response." Sci Signal **3**(141): ra70.

Furst, D. O., M. Osborn, R. Nave and K. Weber (1988). "The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line." J Cell Biol **106**(5): 1563-1572.

Gaburjakova, M., N. C. Bal, J. Gaburjakova and M. Periasamy (2013). "Functional interaction between calsequestrin and ryanodine receptor in the heart." Cell Mol Life Sci **70**(16): 2935-2945.

Gao, L., L. A. Blair and J. Marshall (2006). "CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels." Biochem Biophys Res Commun **345**(4): 1606-1610.

Gao, T., A. Yatani, M. L. Dell'Acqua, H. Sako, S. A. Green, N. Dascal, J. D. Scott and M. M. Hosey (1997). "cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits." Neuron **19**(1): 185-196.

Gardner, C., N. Robas, D. Cawkill and M. Fidock (2000). "Cloning and characterization of the human and mouse PDE7B, a novel cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase." Biochem Biophys Res Commun **272**(1): 186-192.

Gaughan, J. P., C. A. Hefner and S. R. Houser (1998). "Electrophysiological properties of neonatal rat ventricular myocytes with alpha1-adrenergic-induced hypertrophy." Am J Physiol **275**(2 Pt 2): H577-590.

Gautel, M., O. Zuffardi, A. Freiburg and S. Labeit (1995). "Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction?" EMBO J **14**(9): 1952-1960.

Gauthier, C., G. Tavernier, F. Charpentier, D. Langin and H. Le Marec (1996). "Functional beta3-adrenoceptor in the human heart." J Clin Invest **98**(2): 556-562.

Gellen, B., M. Fernandez-Velasco, F. Briec, L. Vinet, K. LeQuang, P. Rouet-Benzineb, J. P. Benitah, M. Pezet, G. Palais, N. Pellegrin, A. Zhang, R. Perrier, B. Escoubet, X. Marniquet, S. Richard, F. Jaisser, A. M. Gomez, F. Charpentier and J. J. Mercadier (2008). "Conditional FKBP12.6 overexpression in mouse cardiac myocytes prevents triggered ventricular tachycardia through specific alterations in excitation-contraction coupling." Circulation **117**(14): 1778-1786.

Gerhardstein, B. L., T. S. Puri, A. J. Chien and M. M. Hosey (1999). "Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels." Biochemistry **38**(32): 10361-10370.

Ghigo, A., A. Perino, H. Mehel, A. Zahradnikova, Jr., F. Morello, J. Leroy, V. O. Nikolaev, F. Damilano, J. Cimino, E. De Luca, W. Richter, R. Westenbroek, W. A. Catterall, J. Zhang, C. Yan, M. Conti, A. M. Gomez, G. Vandecasteele, E. Hirsch and R. Fischmeister (2012). "Phosphoinositide 3-kinase gamma protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases." Circulation **126**(17): 2073-2083.

Ginsburg, K. S. and D. M. Bers (2005). "Isoproterenol does not enhance Ca-dependent Na/Ca exchange current in intact rabbit ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **39**(6): 972-981.

Gloerich, M. and J. L. Bos (2010). "Epac: defining a new mechanism for cAMP action." Annu Rev Pharmacol Toxicol **50**: 355-375.

Gomez, A. M., H. H. Valdivia, H. Cheng, M. R. Lederer, L. F. Santana, M. B. Cannell, S. A. McCune, R. A. Altschuld and W. J. Lederer (1997). "Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure." Science **276**(5313): 800-806.

Gonzalez, G. A. and M. R. Montminy (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133." Cell **59**(4): 675-680.

Gordon, A. M. and G. H. Pollack (1980). "Effects of calcium on the sarcomere length-tension relation in rat cardiac muscle. Implications for the Frank-Starling mechanism." Circ Res **47**(4): 610-619.

- Granzier, H. L. and T. C. Irving (1995). "Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments." Biophys J **68**(3): 1027-1044.
- Granzier, H. L. and S. Labeit (2004). "The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease." Circ Res **94**(3): 284-295.
- Gray, C. B. and J. Heller Brown (2014). "CaMKII δ subtypes: localization and function." Front Pharmacol **5**: 15.
- Grimm, M. and J. H. Brown (2010). "Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII." J Mol Cell Cardiol **48**(2): 322-330.
- Grimm, M., H. Ling and J. H. Brown (2011). "Crossing signals: relationships between beta-adrenergic stimulation and CaMKII activation." Heart Rhythm **8**(8): 1296-1298.
- Guellich, A., H. Mehel and R. Fischmeister (2014). "Cyclic AMP synthesis and hydrolysis in the normal and failing heart." Pflugers Arch **466**(6): 1163-1175.
- Guo, T., R. L. Cornea, S. Huke, E. Camors, Y. Yang, E. Picht, B. R. Fruen and D. M. Bers (2010). "Kinetics of FKBP12.6 binding to ryanodine receptors in permeabilized cardiac myocytes and effects on Ca sparks." Circ Res **106**(11): 1743-1752.
- Guo, T., T. Zhang, R. Mestral and D. M. Bers (2006). "Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes." Circ Res **99**(4): 398-406.
- Gyorke, I., N. Hester, L. R. Jones and S. Gyorke (2004). "The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium." Biophys J **86**(4): 2121-2128.
- Gyorke, S. and M. Fill (1993). "Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in heart." Science **260**(5109): 807-809.
- Ha, C. H., J. Y. Kim, J. Zhao, W. Wang, B. S. Jhun, C. Wong and Z. G. Jin (2010). "PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(35): 15467-15472.
- Haase, H. (2007). "Ahnak, a new player in beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel." Cardiovasc Res **73**(1): 19-25.
- Haase, H., J. Alvarez, D. Petzholt, A. Doller, J. Behlke, J. Erdmann, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek, G. Vassort and I. Morano (2005). "Ahnak is critical for cardiac Ca(V)1.2 calcium channel function and its beta-adrenergic regulation." FASEB J **19**(14): 1969-1977.
- Haase, H., P. Karczewski, R. Beckert and E. G. Krause (1993). "Phosphorylation of the L-type calcium channel beta subunit is involved in beta-adrenergic signal transduction in canine myocardium." FEBS Lett **335**(2): 217-222.

- Hagiwara, N., H. Irisawa and M. Kameyama (1988). "Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells." J Physiol **395**: 233-253.
- Halling, D. B., P. Aracena-Parks and S. L. Hamilton (2006). "Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin." Sci STKE **2006**(318): er1.
- Han, P., X. Zhu and T. Michaeli (1997). "Alternative splicing of the high affinity cAMP-specific phosphodiesterase (PDE7A) mRNA in human skeletal muscle and heart." J Biol Chem **272**(26): 16152-16157.
- Hanoune, J. and N. Defer (2001). "Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 145-174.
- Harrison, S. A., D. H. Reifsnnyder, B. Gallis, G. G. Cadd and J. A. Beavo (1986). "Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotonic drugs." Mol Pharmacol **29**(5): 506-514.
- Hartzell, H. C. and R. Fischmeister (1986). "Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca²⁺ current in single heart cells." Nature **323**(6085): 273-275.
- Hashimoto, Y., R. K. Sharma and T. R. Soderling (1989). "Regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase by the autophosphorylated form of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." J Biol Chem **264**(18): 10884-10887.
- Hausdorff, W. P., M. Bouvier, B. F. O'Dowd, G. P. Irons, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1989). "Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization." J Biol Chem **264**(21): 12657-12665.
- Hayashi, M., K. Matsushima, H. Ohashi, H. Tsunoda, S. Murase, Y. Kawarada and T. Tanaka (1998). "Molecular cloning and characterization of human PDE8B, a novel thyroid-specific isozyme of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase." Biochem Biophys Res Commun **250**(3): 751-756.
- He, R., N. Komaz, D. Ekholm, T. Murata, M. Taira, S. Hockman, E. Degerman and V. C. Manganiello (1998). "Expression and characterization of deletion recombinants of two cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE-3)." Cell Biochem Biophys **29**(1-2): 89-111.
- Heijman, J., M. Dewenter, A. El-Armouche and D. Dobrev (2013). "Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart." J Mol Cell Cardiol **64**: 90-98.
- Heikaus, C. C., J. Pandit and R. E. Klevit (2009). "Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights." Structure **17**(12): 1551-1557.
- Hoch, B., H. Haase, W. Schulze, D. Hagemann, I. Morano, E. G. Krause and P. Karczewski (1998). "Differentiation-dependent expression of cardiac delta-CaMKII isoforms." J Cell Biochem **68**(2): 259-268.

Hoffmann, R., G. S. Baillie, S. J. MacKenzie, S. J. Yarwood and M. D. Houslay (1999). "The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579." EMBO J **18**(4): 893-903.

Hofmann, F., V. Flockerzi, S. Kahl and J. W. Wegener (2014). "L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function." Physiol Rev **94**(1): 303-326.

Hoit, B. D., S. F. Khoury, E. G. Kranias, N. Ball and R. A. Walsh (1995). "In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency." Circ Res **77**(3): 632-637.

Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard and W. Kabsch (1990). "Atomic model of the actin filament." Nature **347**(6288): 44-49.

Hothi, S. S., I. S. Gurung, J. C. Heathcote, Y. Zhang, S. W. Booth, J. N. Skepper, A. A. Grace and C. L. Huang (2008). "Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart." Pflugers Arch **457**(2): 253-270.

Houslay, M. D. and D. R. Adams (2010). "Putting the lid on phosphodiesterase 4." Nat Biotechnol **28**(1): 38-40.

Houslay, M. D., G. S. Baillie and D. H. Maurice (2007). "cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling." Circ Res **100**(7): 950-966.

Huang, C. Y., V. Chau, P. B. Chock, J. H. Wang and R. K. Sharma (1981). "Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: requirement of the binding of four Ca²⁺ to calmodulin for activation." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 871-874.

Hudmon, A., H. Schulman, J. Kim, J. M. Maltez, R. W. Tsien and G. S. Pitt (2005). "CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation." J Cell Biol **171**(3): 537-547.

Huke, S. and D. M. Bers (2008). "Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes." Biochem Biophys Res Commun **376**(1): 80-85.

Hullin, R., D. Singer-Lahat, M. Freichel, M. Biel, N. Dascal, F. Hofmann and V. Flockerzi (1992). "Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain." EMBO J **11**(3): 885-890.

Hulme, J. T., T. W. Lin, R. E. Westenbroek, T. Scheuer and W. A. Catterall (2003). "Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 13093-13098.

Humphrey, J. M. Y., E. am Ende, Christopher W.; Arnold, Eric P.; Head, Jenna L.; Jenkinson, Stephen; Lebel, Lorraine A.; Liras, Spiros; Pandit, Jayvardhan; Samas, Brian; Vajdos, Felix; Simons, Samuel P.; Evdokimov, Artem; Mansoura, Mahmoud; Menniti, Frank S. (2014). "Small-molecule phosphodiesterase probes: discovery of potent and selective CNS-penetrable quinazoline inhibitors of PDE1." Med Chem Comm **5**(9): 1257-1424.

Humphries, K. M., C. Juliano and S. S. Taylor (2002). "Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation." J Biol Chem **277**(45): 43505-43511.

Hurley, J. H. (1999). "Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase." J Biol Chem **274**(12): 7599-7602.

Hussain, M., G. A. Drago, M. Bhogal, J. Colyer and C. H. Orchard (1999). "Effects of the protein kinase A inhibitor H-89 on Ca^{2+} regulation in isolated ferret ventricular myocytes." Pflugers Arch **437**(4): 529-537.

Huxley, A. F. and R. Niedergerke (1954). "Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres." Nature **173**(4412): 971-973.

Huxley, H. and J. Hanson (1954). "Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation." Nature **173**(4412): 973-976.

Huxley, H. E. (2000). "Past, present and future experiments on muscle." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1396): 539-543.

Iwami, G., J. Kawabe, T. Ebina, P. J. Cannon, C. J. Homcy and Y. Ishikawa (1995). "Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A." J Biol Chem **270**(21): 12481-12484.

James, P., M. Inui, M. Tada, M. Chiesi and E. Carafoli (1989). "Nature and site of phospholamban regulation of the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum." Nature **342**(6245): 90-92.

James, P. H., M. Pruschy, T. E. Vorherr, J. T. Penniston and E. Carafoli (1989). "Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump." Biochemistry **28**(10): 4253-4258.

Jansen, J. A., T. A. van Veen, J. M. de Bakker and H. V. van Rijen (2010). "Cardiac connexins and impulse propagation." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 76-82.

Janvier, N. C. and M. R. Boyett (1996). "The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential." Cardiovasc Res **32**(1): 69-84.

Jay, S. D., A. H. Sharp, S. D. Kahl, T. S. Vedvick, M. M. Harpold and K. P. Campbell (1991). "Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides." J Biol Chem **266**(5): 3287-3293.

Jayaraman, T., A. M. Brillantes, A. P. Timerman, S. Fleischer, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and A. R. Marks (1992). "FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor)." J Biol Chem **267**(14): 9474-9477.

Jeong, S. W. and R. D. Wurster (1997). "Calcium channel currents in acutely dissociated intracardiac neurons from adult rats." J Neurophysiol **77**(4): 1769-1778.

Jiang, M. T., A. J. Lokuta, E. F. Farrell, M. R. Wolff, R. A. Haworth and H. H. Valdivia (2002). "Abnormal Ca^{2+} release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure." Circ Res **91**(11): 1015-1022.

Johnson, W. B., S. Katugampola, S. Able, C. Napier and S. E. Harding (2012). "Profiling of cAMP and cGMP phosphodiesterases in isolated ventricular cardiomyocytes from human hearts: comparison with rat and guinea pig." Life Sci **90**(9-10): 328-336.

Jones, B. W., S. Brunet, M. L. Gilbert, C. B. Nichols, T. Su, R. E. Westenbroek, J. D. Scott, W. A. Catterall and G. S. McKnight (2012). "Cardiomyocytes from AKAP7 knockout mice respond normally to adrenergic stimulation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(42): 17099-17104.

Jones, S. W. (1998). "Overview of voltage-dependent calcium channels." J Bioenerg Biomembr **30**(4): 299-312.

Jurevicius, J. and R. Fischmeister (1996). "cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca^{2+} channels by beta-adrenergic agonists." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 295-299.

Kaftan, E., A. R. Marks and B. E. Ehrlich (1996). "Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels from cardiac muscle." Circ Res **78**(6): 990-997.

Kajimoto, K., N. Hagiwara, H. Kasanuki and S. Hosoda (1997). "Contribution of phosphodiesterase isozymes to the regulation of the L-type calcium current in human cardiac myocytes." Br J Pharmacol **121**(8): 1549-1556.

Kakiuchi, S. and R. Yamazaki (1970). "Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3)." Biochem Biophys Res Commun **41**(5): 1104-1110.

Kamp, T. J. and J. W. Hell (2000). "Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C." Circ Res **87**(12): 1095-1102.

Kapiloff, M. S., N. Jackson and N. Airhart (2001). "mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope." J Cell Sci **114**(Pt 17): 3167-3176.

Kapiloff, M. S., L. A. Piggott, R. Sadana, J. Li, L. A. Heredia, E. Henson, R. Efendiev and C. W. Dessauer (2009). "An adenylyl cyclase-mAKAPbeta signaling complex regulates cAMP levels in cardiac myocytes." J Biol Chem **284**(35): 23540-23546.

Kashimura, T., S. J. Briston, A. W. Trafford, C. Napolitano, S. G. Priori, D. A. Eisner and L. A. Venetucci (2010). "In the RyR2(R4496C) mouse model of CPVT, beta-adrenergic stimulation induces Ca waves by increasing SR Ca content and not by decreasing the threshold for Ca waves." Circ Res **107**(12): 1483-1489.

Kasuya, J., H. Goko and Y. Fujita-Yamaguchi (1995). "Multiple transcripts for the human cardiac form of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase." J Biol Chem **270**(24): 14305-14312.

Kawai, M., M. Hussain and C. H. Orchard (1999). "Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 2): H603-609.

Kawasaki, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D. E. Housman and A. M. Graybiel (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." *Science* **282**(5397): 2275-2279.

Keely, S. L. (1979). "Prostaglandin E1 activation of heart cAMP-dependent protein kinase: apparent dissociation of protein kinase activation from increases in phosphorylase activity and contractile force." *Mol Pharmacol* **15**(2): 235-245.

Kemi, O. J., M. A. Hoydal, N. Macquaide, P. M. Haram, L. G. Koch, S. L. Britton, O. Ellingsen, G. L. Smith and U. Wisloff (2011). "The effect of exercise training on transverse tubules in normal, remodeled, and reverse remodeled hearts." *J Cell Physiol* **226**(9): 2235-2243.

Keravis, T. and C. Lugnier (2012). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments." *Br J Pharmacol* **165**(5): 1288-1305.

Kerfant, B. G., D. Zhao, I. Lorenzen-Schmidt, L. S. Wilson, S. Cai, S. R. Chen, D. H. Maurice and P. H. Backx (2007). "PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes." *Circ Res* **101**(4): 400-408.

Kim, C., C. Y. Cheng, S. A. Saldanha and S. S. Taylor (2007). "PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation." *Cell* **130**(6): 1032-1043.

Kim, C., N. H. Xuong and S. S. Taylor (2005). "Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA." *Science* **307**(5710): 690-696.

Kirchberger, M. A., M. Tada, D. I. Repke and A. M. Katz (1972). "Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulation of calcium uptake by canine cardiac microsomes." *J Mol Cell Cardiol* **4**(6): 673-680.

Kirichok, Y., G. Krapivinsky and D. E. Clapham (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." *Nature* **427**(6972): 360-364.

Klarenbeek, J., J. Goedhart, A. van Batenburg, D. Groenewald and K. Jalink (2015). "Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity." *PLoS One* **10**(4): e0122513.

Klarenbeek, J. B., J. Goedhart, M. A. Hink, T. W. Gadella and K. Jalink (2011). "A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range." *PLoS One* **6**(4): e19170.

Kline, C. F. and P. J. Mohler (2013). "Evolving form to fit function: cardiomyocyte intercalated disc and transverse-tubule membranes." *Curr Top Membr* **72**: 121-158.

Klugbauer, N., L. Lacinova, E. Marais, M. Hobom and F. Hofmann (1999). "Molecular diversity of the calcium channel $\alpha 2\delta$ subunit." J Neurosci **19**(2): 684-691.

Knighton, D. R., J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor and J. M. Sowadski (1991). "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." Science **253**(5018): 407-414.

Kobilka, B. K. (2011). "Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology." Trends Pharmacol Sci **32**(4): 213-218.

Kobilka, B. K., H. Matsui, T. S. Kobilka, T. L. Yang-Feng, U. Francke, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and J. W. Regan (1987). "Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet $\alpha 2$ -adrenergic receptor." Science **238**(4827): 650-656.

Komas, N., C. Lugnier, A. Le Bec, C. Serradeil-Le Gal, G. Barthelemy and J. C. Stoclet (1989). "Differential sensitivity to cardiotonic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues." J Cardiovasc Pharmacol **14**(2): 213-220.

Kompa, A. R., P. Molenaar and R. J. Summers (1995). "Beta-adrenoceptor regulation and functional responses in the guinea-pig following chronic administration of the long-acting beta 2-adrenoceptor agonist formoterol." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **351**(6): 576-588.

Koss, K. L., S. Ponniah, W. K. Jones, I. L. Grupp and E. G. Kranias (1995). "Differential phospholamban gene expression in murine cardiac compartments. Molecular and physiological analyses." Circ Res **77**(2): 342-353.

Kostic, M. M., S. Erdogan, G. Rena, G. Borchert, B. Hoch, S. Bartel, G. Scotland, E. Huston, M. D. Houslay and E. G. Krause (1997). "Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart." J Mol Cell Cardiol **29**(11): 3135-3146.

Koval, O. M., X. Guan, Y. Wu, M. L. Joiner, Z. Gao, B. Chen, I. M. Grumbach, E. D. Luczak, R. J. Colbran, L. S. Song, T. J. Hund, P. J. Mohler and M. E. Anderson (2010). "CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(11): 4996-5000.

Krupinski, J., F. Coussen, H. A. Bakalyar, W. J. Tang, P. G. Feinstein, K. Orth, C. Slaughter, R. R. Reed and A. G. Gilman (1989). "Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure." Science **244**(4912): 1558-1564.

Kurokawa, J., S. Adachi-Akahane and T. Nagao (1997). "1,5-benzothiazepine binding domain is located on the extracellular side of the cardiac L-type Ca^{2+} channel." Mol Pharmacol **51**(2): 262-268.

Kuschel, M., Y. Y. Zhou, H. A. Spurgeon, S. Bartel, P. Karczewski, S. J. Zhang, E. G. Krause, E. G. Lakatta and R. P. Xiao (1999). "beta2-adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart." Circulation **99**(18): 2458-2465.

Kushnir, A., J. Shan, M. J. Betzenhauser, S. Reiken and A. R. Marks (2010). "Role of CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(22): 10274-10279.

Kuwabara, Y., K. Kuwahara, M. Takano, H. Kinoshita, Y. Arai, S. Yasuno, Y. Nakagawa, S. Igata, S. Usami, T. Minami, Y. Yamada, K. Nakao, C. Yamada, J. Shibata, T. Nishikimi, K. Ueshima and K. Nakao (2013). "Increased expression of HCN channels in the ventricular myocardium contributes to enhanced arrhythmicity in mouse failing hearts." J Am Heart Assoc **2**(3): e000150.

Lacampagne, A., J. Fauconnier and S. Richard (2008). "[Ryanodine receptor and heart disease]." Med Sci (Paris) **24**(4): 399-405.

Lacolley, P. B., D; Boulanger, C; Ghaleh, B; Louarand, G; Pinet, F; Samuel, JL (2008). Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. Montrouge, John Libbey Eurotext.

Lai, L., L. Yan, S. Gao, C. L. Hu, H. Ge, A. Davidow, M. Park, C. Bravo, K. Iwatsubo, Y. Ishikawa, J. Auwerx, D. A. Sinclair, S. F. Vatner and D. E. Vatner (2013). "Type 5 adenylyl cyclase increases oxidative stress by transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase via the SIRT1/FoxO3a pathway." Circulation **127**(16): 1692-1701.

Lands, A. M., A. Arnold, J. P. McAuliff, F. P. Luduena and T. G. Brown, Jr. (1967). "Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines." Nature **214**(5088): 597-598.

Langer, G. A. and A. Peskoff (1996). "Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell." Biophys J **70**(3): 1169-1182.

Laurent, A. C., M. Breckler, M. Berthouze and F. Lezoualc'h (2012). "Role of Epac in brain and heart." Biochem Soc Trans **40**(1): 51-57.

Laver, D. R., V. J. Owen, P. R. Junankar, N. L. Taske, A. F. Dulhunty and G. D. Lamb (1997). "Reduced inhibitory effect of Mg²⁺ on ryanodine receptor-Ca²⁺ release channels in malignant hyperthermia." Biophys J **73**(4): 1913-1924.

Layland, J., R. J. Solaro and A. M. Shah (2005). "Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation." Cardiovasc Res **66**(1): 12-21.

Leblais, V., S. H. Jo, K. Chakir, V. Maltsev, M. Zheng, M. T. Crow, W. Wang, E. G. Lakatta and R. P. Xiao (2004). "Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca²⁺ influx in cardiomyocytes." Circ Res **95**(12): 1183-1190.

Lee, D. I., G. Zhu, T. Sasaki, G. S. Cho, N. Hamdani, R. Holewinski, S. H. Jo, T. Danner, M. Zhang, P. P. Rainer, D. Bedja, J. A. Kirk, M. J. Ranek, W. R. Dostmann, C. Kwon, K. B. Margulies, J. E. Van Eyk, W. J. Paulus, E. Takimoto and D. A. Kass (2015). "Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease." Nature **519**(7544): 472-476.

Lefkimmiatis, K. and M. Zaccolo (2014). "cAMP signaling in subcellular compartments." Pharmacol Ther **143**(3): 295-304.

- Lefkowitz, R. J. (1993). "G protein-coupled receptor kinases." Cell **74**(3): 409-412.
- Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." Science **308**(5721): 512-517.
- Lehnart, S. E. (2007). "Novel targets for treating heart and muscle disease: stabilizing ryanodine receptors and preventing intracellular calcium leak." Curr Opin Pharmacol **7**(2): 225-232.
- Lehnart, S. E., X. H. Wehrens, S. Reiken, S. Warrier, A. E. Belevych, R. D. Harvey, W. Richter, S. L. Jin, M. Conti and A. R. Marks (2005). "Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias." Cell **123**(1): 25-35.
- Lemke, T., A. Welling, C. J. Christel, A. Blaich, D. Bernhard, P. Lenhardt, F. Hofmann and S. Moosmang (2008). "Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in Ca v 1.2 phosphorylation site S1928A mutant mice." J Biol Chem **283**(50): 34738-34744.
- Leroy, J., A. Abi-Gerges, V. O. Nikolaev, W. Richter, P. Lechene, J. L. Mazet, M. Conti, R. Fischmeister and G. Vandecasteele (2008). "Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca²⁺ channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases." Circ Res **102**(9): 1091-1100.
- Leroy, J., W. Richter, D. Mika, L. R. Castro, A. Abi-Gerges, M. Xie, C. Scheitrum, F. Lefebvre, J. Schittl, P. Mateo, R. Westenbroek, W. A. Catterall, F. Charpentier, M. Conti, R. Fischmeister and G. Vandecasteele (2011). "Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca(2)(+) channel complex regulates Ca(2)(+) current and protects against ventricular arrhythmias in mice." J Clin Invest **121**(7): 2651-2661.
- Leroy, M. J., E. Degerman, M. Taira, T. Murata, L. H. Wang, M. A. Movsesian, E. Meacci and V. C. Manganiello (1996). "Characterization of two recombinant PDE3 (cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase) isoforms, RcGIP1 and HcGIP2, expressed in NIH 3006 murine fibroblasts and Sf9 insect cells." Biochemistry **35**(31): 10194-10202.
- LeWinter, M. M. and H. L. Granzier (2014). "Cardiac titin and heart disease." J Cardiovasc Pharmacol **63**(3): 207-212.
- Li, J., A. Negro, J. Lopez, A. L. Bauman, E. Henson, K. Dodge-Kafka and M. S. Kapiloff (2010). "The mAKAPbeta scaffold regulates cardiac myocyte hypertrophy via recruitment of activated calcineurin." J Mol Cell Cardiol **48**(2): 387-394.
- Liao, Z., D. Lockhead, E. D. Larson and C. Proenza (2010). "Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node." J Gen Physiol **136**(3): 247-258.
- Liggett, S. B., N. J. Freedman, D. A. Schwinn and R. J. Lefkowitz (1993). "Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3665-3669.

- Lim, J., G. Pahlke and M. Conti (1999). "Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain." J Biol Chem **274**(28): 19677-19685.
- Lin, X., H. Jo, Y. Sakakibara, K. Tambara, B. Kim, M. Komeda and S. Matsuoka (2006). "Beta-adrenergic stimulation does not activate Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea pig, mouse, and rat ventricular myocytes." Am J Physiol Cell Physiol **290**(2): C601-608.
- Lissandron, V. and M. Zaccolo (2006). "Compartmentalized cAMP/PKA signalling regulates cardiac excitation-contraction coupling." J Muscle Res Cell Motil **27**(5-7): 399-403.
- Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." Science **248**(4962): 1547-1550.
- Lokuta, A. J., T. B. Rogers, W. J. Lederer and H. H. Valdivia (1995). "Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism." J Physiol **487** (Pt 3): 609-622.
- Lompre, A. M., M. Anger and D. Levitsky (1994). "Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression." J Mol Cell Cardiol **26**(9): 1109-1121.
- Lopreiato, R., M. Giacomello and E. Carafoli (2014). "The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme." J Biol Chem **289**(15): 10261-10268.
- Lou, L. L., S. J. Lloyd and H. Schulman (1986). "Activation of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(24): 9497-9501.
- Loughrey, C. M., T. Seidler, S. L. Miller, J. Prestle, K. E. MacEachern, D. F. Reynolds, G. Hasenfuss and G. L. Smith (2004). "Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation-contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes." J Physiol **556**(Pt 3): 919-934.
- Lowey, S., H. S. Slayter, A. G. Weeds and H. Baker (1969). "Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation." J Mol Biol **42**(1): 1-29.
- Ludtke, S. J., Serysheva, II, S. L. Hamilton and W. Chiu (2005). "The pore structure of the closed RyR1 channel." Structure **13**(8): 1203-1211.
- Lugnier, C. (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents." Pharmacol Ther **109**(3): 366-398.
- Lugnier, C., B. Muller, A. Le Bec, C. Beaudry and E. Rousseau (1993). "Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions." J Pharmacol Exp Ther **265**(3): 1142-1151.

- Lukyanenko, V., S. Viatchenko-Karpinski, A. Smirnov, T. F. Wiesner and S. Gyorke (2001). "Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content and release by luminal Ca^{2+} -sensitive leak in rat ventricular myocytes." Biophys J **81**(2): 785-798.
- Lum, H., H. A. Jaffe, I. T. Schulz, A. Masood, A. RayChaudhury and R. D. Green (1999). "Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction." Am J Physiol **277**(3 Pt 1): C580-588.
- Luo, C. H. and Y. Rudy (1994). "A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes." Circ Res **74**(6): 1071-1096.
- Luo, W., G. Chu, Y. Sato, Z. Zhou, V. J. Kadamby and E. G. Kranias (1998). "Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation." J Biol Chem **273**(8): 4734-4739.
- Luo, W., I. L. Grupp, J. Harrer, S. Ponniah, G. Grupp, J. J. Duffy, T. Doetschman and E. G. Kranias (1994). "Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation." Circ Res **75**(3): 401-409.
- Lygren, B., C. R. Carlson, K. Santamaria, V. Lissandron, T. McSorley, J. Litzenberg, D. Lorenz, B. Wiesner, W. Rosenthal, M. Zaccolo, K. Tasken and E. Klussmann (2007). "AKAP complex regulates Ca^{2+} re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum." EMBO Rep **8**(11): 1061-1067.
- MacDonnell, S. M., G. Garcia-Rivas, J. A. Scherman, H. Kubo, X. Chen, H. Valdivia and S. R. Houser (2008). "Adrenergic regulation of cardiac contractility does not involve phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808." Circ Res **102**(8): e65-72.
- MacLennan, D. H. and P. T. Wong (1971). "Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(6): 1231-1235.
- Main, M. J., C. J. Grantham and M. B. Cannell (1997). "Changes in subsarcolemmal sodium concentration measured by Na-Ca exchanger activity during Na-pump inhibition and beta-adrenergic stimulation in guinea-pig ventricular myocytes." Pflugers Arch **435**(1): 112-118.
- Mangmool, S., A. K. Shukla and H. A. Rockman (2010). "beta-Arrestin-dependent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation." J Cell Biol **189**(3): 573-587.
- Mangoni, M. E., B. Couette, E. Bourinet, J. Platzer, D. Reimer, J. Striessnig and J. Nargeot (2003). "Functional role of L-type Cav1.3 Ca^{2+} channels in cardiac pacemaker activity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5543-5548.
- Mangoni, M. E. and J. Nargeot (2008). "Genesis and regulation of the heart automaticity." Physiol Rev **88**(3): 919-982.

Marais, E., N. Klugbauer and F. Hofmann (2001). "Calcium channel $\alpha(2)\delta$ subunits-structure and Gabapentin binding." Mol Pharmacol **59**(5): 1243-1248.

Martinez, M. L., M. P. Heredia and C. Delgado (1999). "Expression of T-type $\text{Ca}(2+)$ channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts." J Mol Cell Cardiol **31**(9): 1617-1625.

Martinez, S. E., A. Y. Wu, N. A. Glavas, X. B. Tang, S. Turley, W. G. Hol and J. A. Beavo (2002). "The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13260-13265.

Marx, S. O., J. Kurokawa, S. Reiken, H. Motoike, J. D'Armiento, A. R. Marks and R. S. Kass (2002). "Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel." Science **295**(5554): 496-499.

Marx, S. O., S. Reiken, Y. Hisamatsu, M. Gaburjakova, J. Gaburjakova, Y. M. Yang, N. Rosemblyt and A. R. Marks (2001). "Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers." J Cell Biol **153**(4): 699-708.

Marx, S. O., S. Reiken, Y. Hisamatsu, T. Jayaraman, D. Burkhoff, N. Rosemblyt and A. R. Marks (2000). "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts." Cell **101**(4): 365-376.

Matsui, K., T. Kiyosue, J. C. Wang, K. Dohi and M. Arita (1999). "Effects of pimobendan on the L-type Ca^{2+} current and developed tension in guinea-pig ventricular myocytes and papillary muscle: comparison with IBMX, milrinone, and cilostazol." Cardiovasc Drugs Ther **13**(2): 105-113.

Matsuoka, S., D. A. Nicoll, R. F. Reilly, D. W. Hilgemann and K. D. Philipson (1993). "Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}(+)-\text{Ca}^{2+}$ exchanger." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 3870-3874.

Mattiazzi, A., R. A. Bassani, A. L. Escobar, J. Palomeque, C. A. Valverde, M. Vila Petroff and D. M. Bers (2015). "Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade." Am J Physiol Heart Circ Physiol **308**(10): H1177-H1191.

Mattick, P., J. Parrington, E. Odia, A. Simpson, T. Collins and D. Terrar (2007). " Ca^{2+} -stimulated adenylyl cyclase isoform AC1 is preferentially expressed in guinea-pig sino-atrial node cells and modulates the $I(f)$ pacemaker current." J Physiol **582**(Pt 3): 1195-1203.

McKinsey, T. A., C. L. Zhang, J. Lu and E. N. Olson (2000). "Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation." Nature **408**(6808): 106-111.

McMurray, J. J., S. Adamopoulos, S. D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M. A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Kober, G. Y. Lip, A. P. Maggioni, A. Parkhomenko, B. M. Pieske, B. A. Popescu, P. K. Ronnevik, F. H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P. T. Trindade, A. A. Voors, F. Zannad, A. Zeiher and

E. S. C. C. f. P. Guidelines (2012). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC." Eur Heart J **33**(14): 1787-1847.

McVey, M., J. Hill, A. Howlett and C. Klein (1999). "Adenylyl cyclase, a coincidence detector for nitric oxide." J Biol Chem **274**(27): 18887-18892.

Mehel, H., J. Emons, C. Vettel, K. Wittkopper, D. Seppelt, M. Dewenter, S. Lutz, S. Sossalla, L. S. Maier, P. Lechene, J. Leroy, F. Lefebvre, A. Varin, T. Eschenhagen, S. Nattel, D. Dobrev, W. H. Zimmermann, V. O. Nikolaev, G. Vandecasteele, R. Fischmeister and A. El-Armouche (2013). "Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes." J Am Coll Cardiol **62**(17): 1596-1606.

Mery, P. F., S. M. Lohmann, U. Walter and R. Fischmeister (1991). "Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(4): 1197-1201.

Metrich, M., M. Berthouze, E. Morel, B. Crozatier, A. M. Gomez and F. Lezoualc'h (2010). "Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology." Pflugers Arch **459**(4): 535-546.

Metrich, M., A. Lucas, M. Gastineau, J. L. Samuel, C. Heymes, E. Morel and F. Lezoualc'h (2008). "Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy." Circ Res **102**(8): 959-965.

Meyer, M., W. Schillinger, B. Pieske, C. Holubarsch, C. Heilmann, H. Posival, G. Kuwajima, K. Mikoshiba, H. Just, G. Hasenfuss and et al. (1995). "Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy." Circulation **92**(4): 778-784.

Mika, D., P. Bobin, M. Pomerance, P. Lechene, R. E. Westenbroek, W. A. Catterall, G. Vandecasteele, J. Leroy and R. Fischmeister (2013). "Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes." Cardiovasc Res **100**(2): 336-346.

Mika, D., J. Leroy, G. Vandecasteele and R. Fischmeister (2012). "PDEs create local domains of cAMP signaling." J Mol Cell Cardiol **52**(2): 323-329.

Mika, D., W. Richter and M. Conti (2015). "A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(7): 2023-2028.

Mika, D., W. Richter, R. E. Westenbroek, W. A. Catterall and M. Conti (2014). "PDE4B mediates local feedback regulation of beta(1)-adrenergic cAMP signaling in a sarcolemmal compartment of cardiac myocytes." J Cell Sci **127**(Pt 5): 1033-1042.

Mikami, A., K. Imoto, T. Tanabe, T. Niidome, Y. Mori, H. Takeshima, S. Narumiya and S. Numa (1989). "Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel." Nature **340**(6230): 230-233.

- Miki, T., M. Taira, S. Hockman, F. Shimada, J. Lieman, M. Napolitano, D. Ward, M. Taira, H. Makino and V. C. Manganiello (1996). "Characterization of the cDNA and gene encoding human PDE3B, the cGIP1 isoform of the human cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase family." *Genomics* **36**(3): 476-485.
- Mitra, R. and M. Morad (1986). "Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(14): 5340-5344.
- Mittmann, K., K. Jaquet and L. M. Heilmeyer, Jr. (1990). "A common motif of two adjacent phosphoserines in bovine, rabbit and human cardiac troponin I." *FEBS Lett* **273**(1-2): 41-45.
- Mohamed, A. S., J. D. Dignam and K. K. Schlender (1998). "Cardiac myosin-binding protein C (MyBP-C): identification of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation sites." *Arch Biochem Biophys* **358**(2): 313-319.
- Molina, C. E., D. M. Johnson, H. Mehel, R. L. Spatjens, D. Mika, V. Algarrondo, Z. H. Slimane, P. Lechene, N. Abi-Gerges, H. J. van der Linde, J. Leroy, P. G. Volders, R. Fischmeister and G. Vandecasteele (2014). "Interventricular differences in beta-adrenergic responses in the canine heart: role of phosphodiesterases." *J Am Heart Assoc* **3**(3): e000858.
- Molina, C. E., J. Leroy, W. Richter, M. Xie, C. Scheitrum, I. O. Lee, C. Maack, C. Rucker-Martin, P. Donzeau-Gouge, I. Verde, A. Llach, L. Hove-Madsen, M. Conti, G. Vandecasteele and R. Fischmeister (2012). "Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias." *J Am Coll Cardiol* **59**(24): 2182-2190.
- Mongillo, M., T. McSorley, S. Evellin, A. Sood, V. Lissandron, A. Terrin, E. Huston, A. Hannawacker, M. J. Lohse, T. Pozzan, M. D. Houslay and M. Zaccolo (2004). "Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases." *Circ Res* **95**(1): 67-75.
- Mongillo, M., C. G. Tocchetti, A. Terrin, V. Lissandron, Y. F. Cheung, W. R. Dostmann, T. Pozzan, D. A. Kass, N. Paolocci, M. D. Houslay and M. Zaccolo (2006). "Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway." *Circ Res* **98**(2): 226-234.
- Moniotte, S., L. Kobzik, O. Feron, J. N. Trochu, C. Gauthier and J. L. Balligand (2001). "Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium." *Circulation* **103**(12): 1649-1655.
- Morad, M., L. Cleemann and D. R. Menick (2011). "NCX1 phosphorylation dilemma: a little closer to resolution. Focus on "Full-length cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 protein is not phosphorylated by protein kinase A". " *Am J Physiol Cell Physiol* **300**(5): C970-973.
- Morel, E., A. Marcantoni, M. Gastineau, R. Birkedal, F. Rochais, A. Garnier, A. M. Lompre, G. Vandecasteele and F. Lezoualc'h (2005). "cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy." *Circ Res* **97**(12): 1296-1304.

Morimoto, S. (2008). "Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies." Cardiovasc Res **77**(4): 659-666.

Moses, M. A., E. I. Szabo and C. Terner (1987). "Control of low Km cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-phosphodiesterase in prostate and heart of adult and aged rats." Mech Ageing Dev **39**(2): 103-112.

Murashima, S., T. Tanaka, S. Hockman and V. Manganiello (1990). "Characterization of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine brain: purification of a distinct cGMP-stimulated isoenzyme." Biochemistry **29**(22): 5285-5292.

Neef, S., C. M. Sag, M. Daut, H. Baumer, C. Grefe, A. El-Armouche, J. DeSantiago, L. Pereira, D. M. Bers, J. Backs and L. S. Maier (2013). "While systolic cardiomyocyte function is preserved, diastolic myocyte function and recovery from acidosis are impaired in CaMKII δ -KO mice." J Mol Cell Cardiol **59**: 107-116.

Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.

Nerbonne, J. M. and R. S. Kass (2005). "Molecular physiology of cardiac repolarization." Physiol Rev **85**(4): 1205-1253.

Nichols, C. B., C. F. Rossow, M. F. Navedo, R. E. Westenbroek, W. A. Catterall, L. F. Santana and G. S. McKnight (2010). "Sympathetic stimulation of adult cardiomyocytes requires association of AKAP5 with a subpopulation of L-type calcium channels." Circ Res **107**(6): 747-756.

Nicoll, D. A., M. Ottolia and K. D. Philipson (2002). "Toward a topological model of the NCX1 exchanger." Ann N Y Acad Sci **976**: 11-18.

Nikolaev, V. O., M. Bunemann, E. Schmitteckert, M. J. Lohse and S. Engelhardt (2006). "Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching β 1-adrenergic but locally confined β 2-adrenergic receptor-mediated signaling." Circ Res **99**(10): 1084-1091.

Nilius, B., P. Hess, J. B. Lansman and R. W. Tsien (1985). "A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells." Nature **316**(6027): 443-446.

Nuss, H. B. and S. R. Houser (1993). "T-type Ca^{2+} current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes." Circ Res **73**(4): 777-782.

Oestreich, E. A., S. Malik, S. A. Goonasekera, B. C. Blaxall, G. G. Kelley, R. T. Dirksen and A. V. Smrcka (2009). "Epac and phospholipase C ϵ regulate Ca^{2+} release in the heart by activation of protein kinase C ϵ and calcium-calmodulin kinase II." J Biol Chem **284**(3): 1514-1522.

Oestreich, E. A., H. Wang, S. Malik, K. A. Kaproth-Joslin, B. C. Blaxall, G. G. Kelley, R. T. Dirksen and A. V. Smrcka (2007). "Epac-mediated activation of phospholipase C(ϵ) plays a critical role in β -adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca^{2+} mobilization in cardiac myocytes." J Biol Chem **282**(8): 5488-5495.

Oikawa, M., M. Wu, S. Lim, W. E. Knight, C. L. Miller, Y. Cai, Y. Lu, B. C. Blaxall, Y. Takeishi, J. Abe and C. Yan (2013). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury." J Mol Cell Cardiol **64**: 11-19.

Okumura, S., T. Fujita, W. Cai, M. Jin, I. Namekata, Y. Mototani, H. Jin, Y. Ohnuki, Y. Tsuneoka, R. Kurotani, K. Suita, Y. Kawakami, S. Hamaguchi, T. Abe, H. Kiyonari, T. Tsunematsu, Y. Bai, S. Suzuki, Y. Hidaka, M. Umemura, Y. Ichikawa, U. Yokoyama, M. Sato, F. Ishikawa, H. Izumi-Nakaseko, S. Adachi-Akahane, H. Tanaka and Y. Ishikawa (2014). "Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses." J Clin Invest **124**(6): 2785-2801.

Osadchii, O. E. (2007). "Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease." Cardiovasc Drugs Ther **21**(3): 171-194.

Packer, M., J. R. Carver, R. J. Rodeheffer, R. J. Ivanhoe, R. DiBianco, S. M. Zeldis, G. H. Hendrix, W. J. Bommer, U. Elkayam, M. L. Kukin and et al. (1991). "Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group." N Engl J Med **325**(21): 1468-1475.

Pan, X., J. Liu, T. Nguyen, C. Liu, J. Sun, Y. Teng, M. M. Fergusson, Rovira, II, M. Allen, D. A. Springer, A. M. Aponte, M. Gucsek, R. S. Balaban, E. Murphy and T. Finkel (2013). "The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter." Nat Cell Biol **15**(12): 1464-1472.

Parks, R. J., G. Ray, L. A. Bienvenu, R. A. Rose and S. E. Howlett (2014). "Sex differences in SR Ca(2+) release in murine ventricular myocytes are regulated by the cAMP/PKA pathway." J Mol Cell Cardiol **75**: 162-173.

Patrucco, E., M. S. Albergine, L. F. Santana and J. A. Beavo (2010). "Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **49**(2): 330-333.

Patrucco, E., A. Notte, L. Barberis, G. Selvetella, A. Maffei, M. Brancaccio, S. Marengo, G. Russo, O. Azzolino, S. D. Rybalkin, L. Silengo, F. Altruda, R. Wetzker, M. P. Wymann, G. Lembo and E. Hirsch (2004). "PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects." Cell **118**(3): 375-387.

Pavan, B., C. Biondi and A. Dalpiaz (2009). "Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals." Drug Discov Today **14**(19-20): 982-991.

Pavoine, C. and N. Defer (2005). "The cardiac beta2-adrenergic signalling a new role for the cPLA2." Cell Signal **17**(2): 141-152.

Pavoine, C., S. Magne, A. Sauvadet and F. Pecker (1999). "Evidence for a beta2-adrenergic/arachidonic acid pathway in ventricular cardiomyocytes. Regulation by the beta1-adrenergic/camp pathway." J Biol Chem **274**(2): 628-637.

Perchenet, L., A. K. Hinde, K. C. Patel, J. C. Hancox and A. J. Levi (2000). "Stimulation of Na/Ca exchange by the beta-adrenergic/protein kinase A pathway in guinea-pig ventricular myocytes at 37 degrees C." Pflugers Arch **439**(6): 822-828.

Pereira, L., H. Cheng, D. H. Lao, L. Na, R. J. van Oort, J. H. Brown, X. H. Wehrens, J. Chen and D. M. Bers (2013). "Epac2 mediates cardiac beta1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmia." Circulation **127**(8): 913-922.

Pereira, L., M. Metrich, M. Fernandez-Velasco, A. Lucas, J. Leroy, R. Perrier, E. Morel, R. Fischmeister, S. Richard, J. P. Benitah, F. Lezoualc'h and A. M. Gomez (2007). "The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes." J Physiol **583**(Pt 2): 685-694.

Pereira, L., H. Rehmann, D. H. Lao, J. R. Erickson, J. Bossuyt, J. Chen and D. M. Bers (2015). "Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(13): 3991-3996.

Pereira, L., G. Ruiz-Hurtado, E. Morel, A. C. Laurent, M. Metrich, A. Dominguez-Rodriguez, S. Lauton-Santos, A. Lucas, J. P. Benitah, D. M. Bers, F. Lezoualc'h and A. M. Gomez (2012). "Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **52**(1): 283-291.

Perry, S. J., G. S. Baillie, T. A. Kohout, I. McPhee, M. M. Magiera, K. L. Ang, W. E. Miller, A. J. McLean, M. Conti, M. D. Houslay and R. J. Lefkowitz (2002). "Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins." Science **298**(5594): 834-836.

Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, J. P. Adelman and D. T. Yue (1999). "Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels." Neuron **22**(3): 549-558.

Phan, H. M., M. H. Gao, N. C. Lai, T. Tang and H. K. Hammond (2007). "New signaling pathways associated with increased cardiac adenylyl cyclase 6 expression: implications for possible congestive heart failure therapy." Trends Cardiovasc Med **17**(7): 215-221.

Picq, M., M. Dubois, A. Grynberg, M. Lagarde and A. F. Prigent (1995). "Developmental differences in distribution of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cardiomyocytes and the ventricular tissue from newborn and adult rats." J Cardiovasc Pharmacol **26**(5): 742-750.

Pierce, K. L., R. T. Premont and R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 639-650.

Piot, C., S. A. LeMaire, B. Albat, J. Seguin, J. Nargeot and S. Richard (1996). "High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents." Circulation **93**(1): 120-128.

Pogwizd, S. M. and D. M. Bers (2004). "Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure." Trends Cardiovasc Med **14**(2): 61-66.

Pozuelo Rubio, M., D. G. Campbell, N. A. Morrice and C. Mackintosh (2005). "Phosphodiesterase 3A binds to 14-3-3 proteins in response to PMA-induced phosphorylation of Ser428." Biochem J **392**(Pt 1): 163-172.

Priebe, L. and D. J. Beuckelmann (1998). "Simulation study of cellular electric properties in heart failure." Circ Res **82**(11): 1206-1223.

Prosser, B. L., C. W. Ward and W. J. Lederer (2011). "X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart." Science **333**(6048): 1440-1445.

Qiao, J., F. C. Mei, V. L. Popov, L. A. Vergara and X. Cheng (2002). "Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP." J Biol Chem **277**(29): 26581-26586.

Rall, T. W. and E. W. Sutherland (1958). "Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles." J Biol Chem **232**(2): 1065-1076.

Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Holmes and R. A. Milligan (1993). "Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction." Science **261**(5117): 58-65.

Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg and H. M. Holden (1993). "Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor." Science **261**(5117): 50-58.

Rehmann, H., E. Arias-Palomo, M. A. Hadders, F. Schwede, O. Llorca and J. L. Bos (2008). "Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B." Nature **455**(7209): 124-127.

Rehmann, H., J. Das, P. Knipscheer, A. Wittinghofer and J. L. Bos (2006). "Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state." Nature **439**(7076): 625-628.

Rellos, P., A. C. Pike, F. H. Niesen, E. Salah, W. H. Lee, F. von Delft and S. Knapp (2010). "Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation." PLoS Biol **8**(7): e1000426.

Reppel, M., B. K. Fleischmann, H. Reuter, P. Sasse, H. Schunkert and J. Hescheler (2007). "Regulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in the murine embryonic heart." Cardiovasc Res **75**(1): 99-108.

Reuter, H. (1967). "The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration." J Physiol **192**(2): 479-492.

Reuter, H. and N. Seitz (1968). "The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition." J Physiol **195**(2): 451-470.

Rezazadeh, S., T. W. Claydon and D. Fedida (2006). "KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels." J Pharmacol Exp Ther **317**(1): 292-299.

Richard, S., E. Perrier, J. Fauconnier, R. Perrier, L. Pereira, A. M. Gomez and J. P. Benitah (2006). "'Ca²⁺-induced Ca²⁺ entry' or how the L-type Ca²⁺ channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells." Prog Biophys Mol Biol **90**(1-3): 118-135.

Richter, W. and M. Conti (2002). "Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs)." J Biol Chem **277**(43): 40212-40221.

Richter, W., P. Day, R. Agrawal, M. D. Bruss, S. Granier, Y. L. Wang, S. G. Rasmussen, K. Horner, P. Wang, T. Lei, A. J. Patterson, B. Kobilka and M. Conti (2008). "Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4." EMBO J **27**(2): 384-393.

Richter, W., S. L. Jin and M. Conti (2005). "Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue." Biochem J **388**(Pt 3): 803-811.

Richter, W., D. Mika, E. Blanchard, P. Day and M. Conti (2013). "beta1-adrenergic receptor antagonists signal via PDE4 translocation." EMBO Rep **14**(3): 276-283.

Richter, W., M. Xie, C. Scheitrum, J. Krall, M. A. Movsesian and M. Conti (2011). "Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart." Basic Res Cardiol **106**(2): 249-262.

Ringer, S. (1883). "A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart." J Physiol **4**(1): 29-42 23.

Rochais, F., A. Abi-Gerges, K. Horner, F. Lefebvre, D. M. Cooper, M. Conti, R. Fischmeister and G. Vandecasteele (2006). "A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes." Circ Res **98**(8): 1081-1088.

Rochais, F., G. Vandecasteele, F. Lefebvre, C. Lugnier, H. Lum, J. L. Mazet, D. M. Cooper and R. Fischmeister (2004). "Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels." J Biol Chem **279**(50): 52095-52105.

Roderick, H. L., M. J. Berridge and M. D. Bootman (2003). "Calcium-induced calcium release." Curr Biol **13**(11): R425.

Rohrer, D. K., A. Chruscinski, E. H. Schauble, D. Bernstein and B. K. Kobilka (1999). "Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors." J Biol Chem **274**(24): 16701-16708.

Rousseau, E., J. Ladine, Q. Y. Liu and G. Meissner (1988). "Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds." Arch Biochem Biophys **267**(1): 75-86.

Ruehr, M. L., M. A. Russell and M. Bond (2004). "A-kinase anchoring protein targeting of protein kinase A in the heart." J Mol Cell Cardiol **37**(3): 653-665.

Ruiz-Hurtado, G., A. Dominguez-Rodriguez, L. Pereira, M. Fernandez-Velasco, C. Cassan, F. Lezoualc'h, J. P. Benitah and A. M. Gomez (2012). "Sustained Epac activation induces

calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **53**(5): 617-625.

Ruiz-Hurtado, G., E. Morel, A. Dominguez-Rodriguez, A. Llach, F. Lezoualc'h, J. P. Benitah and A. M. Gomez (2013). "Epac in cardiac calcium signaling." J Mol Cell Cardiol **58**: 162-171.

Russwurm, C., G. Zoidl, D. Koesling and M. Russwurm (2009). "Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes." J Biol Chem **284**(38): 25782-25790.

Sadayappan, S., J. Gulick, R. Klevitsky, J. N. Lorenz, M. Sargent, J. D. Molkenstein and J. Robbins (2009). "Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation in a {beta}-myosin heavy chain background." Circulation **119**(9): 1253-1262.

Said, M., C. Mundina-Weilenmann, L. Vittone and A. Mattiazzi (2002). "The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation." Pflugers Arch **444**(6): 801-809.

Saitoh, T. and J. H. Schwartz (1985). "Phosphorylation-dependent subcellular translocation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase produces an autonomous enzyme in Aplysia neurons." J Cell Biol **100**(3): 835-842.

Sands, W. A. and T. M. Palmer (2008). "Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation." Cell Signal **20**(3): 460-466.

Santiago-Garcia, J., J. Mas-Oliva, D. Saavedra and A. Zarain-Herzberg (1996). "Analysis of mRNA expression and cloning of a novel plasma membrane Ca(2+)-ATPase splice variant in human heart." Mol Cell Biochem **155**(2): 173-182.

Sassi, Y., A. Abi-Gerges, J. Fauconnier, N. Mougenot, S. Reiken, K. Haghighi, E. G. Kranias, A. R. Marks, A. Lacampagne, S. Engelhardt, S. N. Hatem, A. M. Lompre and J. S. Hultot (2012). "Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes." FASEB J **26**(3): 1009-1017.

Saucerman, J. J. and D. M. Bers (2008). "Calmodulin mediates differential sensitivity of CaMKII and calcineurin to local Ca²⁺ in cardiac myocytes." Biophys J **95**(10): 4597-4612.

Saucerman, J. J., J. Zhang, J. C. Martin, L. X. Peng, A. E. Stenbit, R. Y. Tsien and A. D. McCulloch (2006). "Systems analysis of PKA-mediated phosphorylation gradients in live cardiac myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12923-12928.

Schmidt, M., S. Evellin, P. A. Weernink, F. von Dorp, H. Rehmann, J. W. Lomasney and K. H. Jakobs (2001). "A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase." Nat Cell Biol **3**(11): 1020-1024.

Schneider, M. F. and W. K. Chandler (1973). "Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling." Nature **242**(5395): 244-246.

Scholten, A., T. A. van Veen, M. A. Vos and A. J. Heck (2007). "Diversity of cAMP-dependent protein kinase isoforms and their anchoring proteins in mouse ventricular tissue." J Proteome Res **6**(5): 1705-1717.

Schroder, F., R. Handrock, D. J. Beuckelmann, S. Hirt, R. Hullin, L. Priebe, R. H. Schwinger, J. Weil and S. Herzig (1998). "Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle." Circulation **98**(10): 969-976.

Schulman, H. and P. Greengard (1978). "Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator"." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(11): 5432-5436.

Schulman, H. and P. Greengard (1978). "Stimulation of brain membrane protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat-stable protein." Nature **271**(5644): 478-479.

Schworer, C. M., R. J. Colbran, J. R. Keefer and T. R. Soderling (1988). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of a regulatory autophosphorylation site adjacent to the inhibitory and calmodulin-binding domains." J Biol Chem **263**(27): 13486-13489.

Scott, J. D., C. W. Dessauer and K. Tasken (2013). "Creating order from chaos: cellular regulation by kinase anchoring." Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 187-210.

Scott, J. D., E. H. Fischer, K. Takio, J. G. Demaille and E. G. Krebs (1985). "Amino acid sequence of the heat-stable inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5732-5736.

Scott, J. D. and T. Pawson (2009). "Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart." Science **326**(5957): 1220-1224.

Scriven, D. R., P. Dan and E. D. Moore (2000). "Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes." Biophys J **79**(5): 2682-2691.

Sette, C. and M. Conti (1996). "Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation." J Biol Chem **271**(28): 16526-16534.

Shah, A. S., D. C. White, S. Emani, A. P. Kypson, R. E. Lilly, K. Wilson, D. D. Glower, R. J. Lefkowitz and W. J. Koch (2001). "In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction." Circulation **103**(9): 1311-1316.

Shakur, Y., M. Fong, J. Hensley, J. Cone, M. A. Movsesian, J. Kambayashi, M. Yoshitake and Y. Liu (2002). "Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on cAMP-PDE activity, intracellular cAMP and calcium in the heart." Cardiovasc Drugs Ther **16**(5): 417-427.

Shakur, Y., L. S. Holst, T. R. Landstrom, M. Movsesian, E. Degerman and V. Manganiello (2001). "Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **66**: 241-277.

Shan, J., W. Xie, M. Betzenhauser, S. Reiken, B. X. Chen, A. Wronska and A. R. Marks (2012). "Calcium leak through ryanodine receptors leads to atrial fibrillation in 3 mouse models of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." Circ Res **111**(6): 708-717.

Shannon, T. R., G. Chu, E. G. Kranias and D. M. Bers (2001). "Phospholamban decreases the energetic efficiency of the sarcoplasmic reticulum Ca pump." J Biol Chem **276**(10): 7195-7201.

Shannon, T. R., K. S. Ginsburg and D. M. Bers (2002). "Quantitative assessment of the SR Ca²⁺ leak-load relationship." Circ Res **91**(7): 594-600.

Sharma, R. K. and J. H. Wang (1985). "Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(9): 2603-2607.

Shaw, R. M. and H. M. Colecraft (2013). "L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes." Cardiovasc Res **98**(2): 177-186.

Shibasaki, F., E. R. Price, D. Milan and F. McKeon (1996). "Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4." Nature **382**(6589): 370-373.

Shoji, S., D. C. Parmelee, R. D. Wade, S. Kumar, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, H. Neurath, G. L. Long, J. G. Demaille, E. H. Fischer and K. Titani (1981). "Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 848-851.

Shull, G. E. and J. Greeb (1988). "Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na⁺,K⁺- and other cation transport ATPases." J Biol Chem **263**(18): 8646-8657.

Shuntoh, H., N. Sakamoto, S. Matsuyama, M. Saitoh and C. Tanaka (1992). "Molecular structure of the C beta catalytic subunit of rat cAMP-dependent protein kinase and differential expression of C alpha and C beta isoforms in rat tissues and cultured cells." Biochim Biophys Acta **1131**(2): 175-180.

Siedlecka, U., M. Arora, T. Kolettis, G. K. Soppa, J. Lee, M. A. Stagg, S. E. Harding, M. H. Yacoub and C. M. Terracciano (2008). "Effects of clenbuterol on contractility and Ca²⁺ homeostasis of isolated rat ventricular myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(5): H1917-1926.

Simmerman, H. K., J. H. Collins, J. L. Theibert, A. D. Wegener and L. R. Jones (1986). "Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains." J Biol Chem **261**(28): 13333-13341.

Sipido, K. R., P. G. Volders, M. A. Vos and F. Verdonck (2002). "Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy?" Cardiovasc Res **53**(4): 782-805.

Skalhegg, B. S. and K. Tasken (2000). "Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA." Front Biosci **5**: D678-693.

Skeberdis, V. A., V. Gendviliene, D. Zablockaitė, R. Treinys, R. Macianskiene, A. Bogdelis, J. Jurevicius and R. Fischmeister (2008). "beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca²⁺ current." J Clin Invest **118**(9): 3219-3227.

Skelding, K. A., J. A. Rostas and N. M. Verrills (2011). "Controlling the cell cycle: the role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II." Cell Cycle **10**(4): 631-639.

Smallwood, J. I., B. Gugi and H. Rasmussen (1988). "Regulation of erythrocyte Ca²⁺ pump activity by protein kinase C." J Biol Chem **263**(5): 2195-2202.

Smith, C. J., R. Huang, D. Sun, S. Ricketts, C. Hoegler, J. Z. Ding, R. A. Moggio and T. H. Hintze (1997). "Development of decompensated dilated cardiomyopathy is associated with decreased gene expression and activity of the milrinone-sensitive cAMP phosphodiesterase PDE3A." Circulation **96**(9): 3116-3123.

Smrcka, A. V., E. A. Oestreich, B. C. Blaxall and R. T. Dirksen (2007). "EPAC regulation of cardiac EC coupling." J Physiol **584**(Pt 3): 1029-1031.

Soderling, S. H., S. J. Bayuga and J. A. Beavo (1998). "Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8991-8996.

Soeller, C. and M. B. Cannell (1999). "Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques." Circ Res **84**(3): 266-275.

Somekawa, S., S. Fukuhara, Y. Nakaoka, H. Fujita, Y. Saito and N. Mochizuki (2005). "Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes." Circ Res **97**(7): 655-662.

Sonnenburg, W. K., P. J. Mullaney and J. A. Beavo (1991). "Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants." J Biol Chem **266**(26): 17655-17661.

Sonnenburg, W. K., D. Seger, K. S. Kwak, J. Huang, H. Charbonneau and J. A. Beavo (1995). "Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases." J Biol Chem **270**(52): 30989-31000.

Sorensen, A. B., M. T. Sondergaard and M. T. Overgaard (2013). "Calmodulin in a heartbeat." FEBS J **280**(21): 5511-5532.

Sprenger, J. U., R. K. Perera, J. H. Steinbrecher, S. E. Lehnart, L. S. Maier, G. Hasenfuss and V. O. Nikolaev (2015). "In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease." Nat Commun **6**: 6965.

Srinivasan, M., C. F. Edman and H. Schulman (1994). "Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus." J Cell Biol **126**(4): 839-852.

Steinberg, S. F. (1999). "The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes." Circ Res **85**(11): 1101-1111.

Stengl, M., K. Mubagwa, E. Carmeliet and W. Flameng (1998). "Phenylephrine-induced stimulation of Na⁺/Ca²⁺ exchange in rat ventricular myocytes." Cardiovasc Res **38**(3): 703-710.

Stratton, M. M., L. H. Chao, H. Schulman and J. Kuriyan (2013). "Structural studies on the regulation of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II." Curr Opin Struct Biol **23**(2): 292-301.

Striessnig, J., H. Glossmann and W. A. Catterall (1990). "Identification of a phenylalkylamine binding region within the alpha 1 subunit of skeletal muscle Ca²⁺ channels." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(23): 9108-9112.

Striessnig, J., B. J. Murphy and W. A. Catterall (1991). "Dihydropyridine receptor of L-type Ca²⁺ channels: identification of binding domains for [3H](+)-PN200-110 and [3H]azidopine within the alpha 1 subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10769-10773.

Sun, B., H. Li, Y. Shakur, J. Hensley, S. Hockman, J. Kambayashi, V. C. Manganiello and Y. Liu (2007). "Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice." Cell Signal **19**(8): 1765-1771.

Sunahara, R. K., C. W. Dessauer and A. G. Gilman (1996). "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 461-480.

Swiderek, K., K. Jaquet, H. E. Meyer and L. M. Heilmeyer, Jr. (1988). "Cardiac troponin I, isolated from bovine heart, contains two adjacent phosphoserines. A first example of phosphoserine determination by derivatization to S-ethylcysteine." Eur J Biochem **176**(2): 335-342.

Tada, M., M. A. Kirchberger and A. M. Katz (1975). "Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." J Biol Chem **250**(7): 2640-2647.

Takeshima, H., S. Komazaki, K. Hirose, M. Nishi, T. Noda and M. Iino (1998). "Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2." EMBO J **17**(12): 3309-3316.

Tasken, K. and E. M. Aandahl (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." Physiol Rev **84**(1): 137-167.

- Tavernier, G., G. Toumaniantz, M. Erfanian, M. F. Heymann, K. Laurent, D. Langin and C. Gauthier (2003). "beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor." Cardiovasc Res **59**(2): 288-296.
- Taylor, S. S., C. Kim, D. Vigil, N. M. Haste, J. Yang, J. Wu and G. S. Anand (2005). "Dynamics of signaling by PKA." Biochim Biophys Acta **1754**(1-2): 25-37.
- Terrenoire, C., M. D. Houslay, G. S. Baillie and R. S. Kass (2009). "The cardiac IKs potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3." J Biol Chem **284**(14): 9140-9146.
- Tiaho, F., C. Piot, J. Nargeot and S. Richard (1994). "Regulation of the frequency-dependent facilitation of L-type Ca²⁺ currents in rat ventricular myocytes." J Physiol **477** (Pt 2): 237-251.
- Timerman, A. P., T. Jayaraman, G. Wiederrecht, H. Onoue, A. R. Marks and S. Fleischer (1994). "The ryanodine receptor from canine heart sarcoplasmic reticulum is associated with a novel FK-506 binding protein." Biochem Biophys Res Commun **198**(2): 701-706.
- Tobimatsu, T. and H. Fujisawa (1989). "Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs." J Biol Chem **264**(30): 17907-17912.
- Tombes, R. M., M. O. Faison and J. M. Turbeville (2003). "Organization and evolution of multifunctional Ca(2+)/CaM-dependent protein kinase genes." Gene **322**: 17-31.
- Tong, C. W., R. D. Gaffin, D. C. Zawieja and M. Muthuchamy (2004). "Roles of phosphorylation of myosin binding protein-C and troponin I in mouse cardiac muscle twitch dynamics." J Physiol **558**(Pt 3): 927-941.
- Trafford, A. W., M. E. Diaz and D. A. Eisner (2001). "Coordinated control of cell Ca(2+) loading and triggered release from the sarcoplasmic reticulum underlies the rapid inotropic response to increased L-type Ca(2+) current." Circ Res **88**(2): 195-201.
- Trafford, A. W., M. E. Diaz, N. Negretti and D. A. Eisner (1997). "Enhanced Ca²⁺ current and decreased Ca²⁺ efflux restore sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content after depletion." Circ Res **81**(4): 477-484.
- Tran, T. M., J. Friedman, E. Qunaibi, F. Baameur, R. H. Moore and R. B. Clark (2004). "Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies." Mol Pharmacol **65**(1): 196-206.
- Tsai, L. C., M. Shimizu-Albergine and J. A. Beavo (2011). "The high-affinity cAMP-specific phosphodiesterase 8B controls steroidogenesis in the mouse adrenal gland." Mol Pharmacol **79**(4): 639-648.
- Uhler, M. D., D. F. Carmichael, D. C. Lee, J. C. Chrivia, E. G. Krebs and G. S. McKnight (1986). "Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(5): 1300-1304.

van der Heyden, M. A., T. J. Wijnhoven and T. Opthof (2005). "Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels." Cardiovasc Res **65**(1): 28-39.

Vandecasteele, G., I. Verde, C. Rucker-Martin, P. Donzeau-Gouge and R. Fischmeister (2001). "Cyclic GMP regulation of the L-type Ca^{2+} channel current in human atrial myocytes." J Physiol **533**(Pt 2): 329-340.

Vandeput, F., S. L. Wolda, J. Krall, R. Hambleton, L. Uher, K. N. McCaw, P. B. Radwanski, V. Florio and M. A. Movsesian (2007). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes." J Biol Chem **282**(45): 32749-32757.

Vang, A. G., S. Z. Ben-Sasson, H. Dong, B. Kream, M. P. DeNinno, M. M. Claffey, W. Housley, R. B. Clark, P. M. Epstein and S. Brocke (2010). "PDE8 regulates rapid Tef cell adhesion and proliferation independent of ICER." PLoS One **5**(8): e12011.

Vangheluwe, P., L. Raeymaekers, L. Dode and F. Wuytack (2005). "Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications." Cell Calcium **38**(3-4): 291-302.

Varadi, G., M. Strobeck, S. Koch, L. Caglioti, C. Zucchi and G. Palyi (1999). "Molecular elements of ion permeation and selectivity within calcium channels." Crit Rev Biochem Mol Biol **34**(3): 181-214.

Vatner, S. F., L. Yan, Y. Ishikawa, D. E. Vatner and J. Sadoshima (2009). "Adenylyl cyclase type 5 disruption prolongs longevity and protects the heart against stress." Circ J **73**(2): 195-200.

Vaughan, D. J., E. E. Millman, V. Godines, J. Friedman, T. M. Tran, W. Dai, B. J. Knoll, R. B. Clark and R. H. Moore (2006). "Role of the G protein-coupled receptor kinase site serine cluster in beta2-adrenergic receptor internalization, desensitization, and beta-arrestin translocation." J Biol Chem **281**(11): 7684-7692.

Venetucci, L. A., A. W. Trafford and D. A. Eisner (2007). "Increasing ryanodine receptor open probability alone does not produce arrhythmogenic calcium waves: threshold sarcoplasmic reticulum calcium content is required." Circ Res **100**(1): 105-111.

Venetucci, L. A., A. W. Trafford, S. C. O'Neill and D. A. Eisner (2007). "Na/Ca exchange: regulator of intracellular calcium and source of arrhythmias in the heart." Ann N Y Acad Sci **1099**: 315-325.

Verde, I., G. Pahlke, M. Salanova, G. Zhang, S. Wang, D. Coletti, J. Onuffer, S. L. Jin and M. Conti (2001). "Myomegalin is a novel protein of the golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase." J Biol Chem **276**(14): 11189-11198.

Verde, I., G. Vandecasteele, F. Lezoualc'h and R. Fischmeister (1999). "Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes." Br J Pharmacol **127**(1): 65-74.

Verma, A. K., A. G. Filoteo, D. R. Stanford, E. D. Wieben, J. T. Penniston, E. E. Strehler, R. Fischer, R. Heim, G. Vogel, S. Mathews and et al. (1988). "Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump." J Biol Chem **263**(28): 14152-14159.

Vincent, K. P., A. D. McCulloch and A. G. Edwards (2014). "Toward a hierarchy of mechanisms in CaMKII-mediated arrhythmia." Front Pharmacol **5**: 110.

Voigt, N., N. Li, Q. Wang, W. Wang, A. W. Trafford, I. Abu-Taha, Q. Sun, T. Wieland, U. Ravens, S. Nattel, X. H. Wehrens and D. Dobrev (2012). "Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation." Circulation **125**(17): 2059-2070.

Walsh, D. A., C. D. Ashby, C. Gonzalez, D. Calkins and E. H. Fischer (1971). "Krebs EG: Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases." J Biol Chem **246**(7): 1977-1985.

Walsh, D. A., J. P. Perkins and E. G. Krebs (1968). "An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle." J Biol Chem **243**(13): 3763-3765.

Wang, K. K., L. C. Wright, C. L. Machan, B. G. Allen, A. D. Conigrave and B. D. Roufogalis (1991). "Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase from human erythrocytes." J Biol Chem **266**(14): 9078-9085.

Wang, S., W. R. Trumble, H. Liao, C. R. Wesson, A. K. Dunker and C. H. Kang (1998). "Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum." Nat Struct Biol **5**(6): 476-483.

Wang, W., W. Zhu, S. Wang, D. Yang, M. T. Crow, R. P. Xiao and H. Cheng (2004). "Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway." Circ Res **95**(8): 798-806.

Wang, Y., S. Tandan, J. Cheng, C. Yang, L. Nguyen, J. Sugianto, J. L. Johnstone, Y. Sun and J. A. Hill (2008). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent remodeling of Ca²⁺ current in pressure overload heart failure." J Biol Chem **283**(37): 25524-25532.

Wanichawan, P., W. E. Louch, K. H. Hortemo, B. Austbo, P. K. Lunde, J. D. Scott, O. M. Sejersted and C. R. Carlson (2011). "Full-length cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 protein is not phosphorylated by protein kinase A." Am J Physiol Cell Physiol **300**(5): C989-997.

Wechsler, J., Y. H. Choi, J. Krall, F. Ahmad, V. C. Manganiello and M. A. Movsesian (2002). "Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes." J Biol Chem **277**(41): 38072-38078.

Weeds, A. G. and S. Lowey (1971). "Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin." J Mol Biol **61**(3): 701-725.

Wegener, A. D. and L. R. Jones (1984). "Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Evidence for a protein structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits." J Biol Chem **259**(3): 1834-1841.

Wegener, A. D., H. K. Simmerman, J. Liepnieks and L. R. Jones (1986). "Proteolytic cleavage of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum

vesicles. Generation of a low resolution model of phospholamban structure." J Biol Chem **261**(11): 5154-5159.

Wegener, A. D., H. K. Simmerman, J. P. Lindemann and L. R. Jones (1989). "Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation." J Biol Chem **264**(19): 11468-11474.

Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, F. Huang, J. A. Vest, S. R. Reiken, P. J. Mohler, J. Sun, S. Guatimosim, L. S. Song, N. Rosemblyt, J. M. D'Armiento, C. Napolitano, M. Memmi, S. G. Priori, W. J. Lederer and A. R. Marks (2003). "FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death." Cell **113**(7): 829-840.

Wehrens, X. H., S. E. Lehnart and A. R. Marks (2005). "Intracellular calcium release and cardiac disease." Annu Rev Physiol **67**: 69-98.

Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, S. Reiken, R. van der Nagel, R. Morales, J. Sun, Z. Cheng, S. X. Deng, L. J. de Windt, D. W. Landry and A. R. Marks (2005). "Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(27): 9607-9612.

Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, S. R. Reiken, S. X. Deng, J. A. Vest, D. Cervantes, J. Coromilas, D. W. Landry and A. R. Marks (2004). "Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2." Science **304**(5668): 292-296.

Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, S. R. Reiken and A. R. Marks (2004). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor." Circ Res **94**(6): e61-70.

Wei, S. K., S. U. Hanlon and M. C. Haigney (2002). "Beta-adrenergic stimulation of pig myocytes with decreased cytosolic free magnesium prolongs the action potential and enhances triggered activity." J Cardiovasc Electrophysiol **13**(6): 587-592.

Weishaar, R. E., D. C. Kobylarz-Singer, R. P. Steffen and H. R. Kaplan (1987). "Subclasses of cyclic AMP-specific phosphodiesterase in left ventricular muscle and their involvement in regulating myocardial contractility." Circ Res **61**(4): 539-547.

Welch, E. J., B. W. Jones and J. D. Scott (2010). "Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes." Mol Interv **10**(2): 86-97.

White, D. C., J. A. Hata, A. S. Shah, D. D. Glower, R. J. Lefkowitz and W. J. Koch (2000). "Preservation of myocardial beta-adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5428-5433.

White, S. P., C. Cohen and G. N. Phillips, Jr. (1987). "Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin." Nature **325**(6107): 826-828.

Winegrad, S. (1999). "Cardiac myosin binding protein C." Circ Res **84**(10): 1117-1126.

Winslow, R. L., J. Rice, S. Jafri, E. Marban and B. O'Rourke (1999). "Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, II: model studies." Circ Res **84**(5): 571-586.

Witcher, D. R., R. J. Kovacs, H. Schulman, D. C. Cefali and L. R. Jones (1991). "Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity." J Biol Chem **266**(17): 11144-11152.

Woodgett, J. R., M. T. Davison and P. Cohen (1983). "The calmodulin-dependent glycogen synthase kinase from rabbit skeletal muscle. Purification, subunit structure and substrate specificity." Eur J Biochem **136**(3): 481-487.

Wu, G. C., H. L. Lai, Y. W. Lin, Y. T. Chu and Y. Chern (2001). "N-glycosylation and residues Asn805 and Asn890 are involved in the functional properties of type VI adenylyl cyclase." J Biol Chem **276**(38): 35450-35457.

Wu, K. D., W. S. Lee, J. Wey, D. Bungard and J. Lytton (1995). "Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts." Am J Physiol **269**(3 Pt 1): C775-784.

Wu, X. and C. T. McMurray (2001). "Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein." J Biol Chem **276**(3): 1735-1741.

Wu, X., T. Zhang, J. Bossuyt, X. Li, T. A. McKinsey, J. R. Dedman, E. N. Olson, J. Chen, J. H. Brown and D. M. Bers (2006). "Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling." J Clin Invest **116**(3): 675-682.

Xiang, Y. and B. K. Kobilka (2003). "Myocyte adrenoceptor signaling pathways." Science **300**(5625): 1530-1532.

Xiao, B., M. T. Jiang, M. Zhao, D. Yang, C. Sutherland, F. A. Lai, M. P. Walsh, D. C. Warltier, H. Cheng and S. R. Chen (2005). "Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure." Circ Res **96**(8): 847-855.

Xiao, K., D. B. McClatchy, A. K. Shukla, Y. Zhao, M. Chen, S. K. Shenoy, J. R. Yates, 3rd and R. J. Lefkowitz (2007). "Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12011-12016.

Xiao, R. P., P. Avdonin, Y. Y. Zhou, H. Cheng, S. A. Akhter, T. Eschenhagen, R. J. Lefkowitz, W. J. Koch and E. G. Lakatta (1999). "Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes." Circ Res **84**(1): 43-52.

Xiao, R. P., H. Cheng, W. J. Lederer, T. Suzuki and E. G. Lakatta (1994). "Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9659-9663.

Xiao, R. P., X. Ji and E. G. Lakatta (1995). "Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes." Mol Pharmacol **47**(2): 322-329.

- Xiao, R. P. and E. G. Lakatta (1993). "Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca²⁺, and Ca²⁺ current in single rat ventricular cells." Circ Res **73**(2): 286-300.
- Xiao, R. P., W. Zhu, M. Zheng, K. Chakir, R. Bond, E. G. Lakatta and H. Cheng (2004). "Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications." Trends Pharmacol Sci **25**(7): 358-365.
- Xie, M., B. Blackman, C. Scheitrum, D. Mika, E. Blanchard, T. Lei, M. Conti and W. Richter (2014). "The upstream conserved regions (UCRs) mediate homo- and hetero-oligomerization of type 4 cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE4s)." Biochem J **459**(3): 539-550.
- Xiong, L. W., R. A. Newman, G. G. Rodney, O. Thomas, J. Z. Zhang, A. Persechini, M. A. Shea and S. L. Hamilton (2002). "Lobe-dependent regulation of ryanodine receptor type 1 by calmodulin." J Biol Chem **277**(43): 40862-40870.
- Xu, L., J. P. Eu, G. Meissner and J. S. Stamler (1998). "Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation." Science **279**(5348): 234-237.
- Yamasaki, R., Y. Wu, M. McNabb, M. Greaser, S. Labeit and H. Granzier (2002). "Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes." Circ Res **90**(11): 1181-1188.
- Yan, C., C. L. Miller and J. Abe (2007). "Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart." Circ Res **100**(4): 489-501.
- Yang, J., P. T. Ellinor, W. A. Sather, J. F. Zhang and R. W. Tsien (1993). "Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels." Nature **366**(6451): 158-161.
- Yang, L., A. Katchman, T. Samad, J. P. Morrow, R. L. Weinberg and S. O. Marx (2013). "beta-adrenergic regulation of the L-type Ca²⁺ channel does not require phosphorylation of alpha1C Ser1700." Circ Res **113**(7): 871-880.
- Yang, Q., M. Paskind, G. Bolger, W. J. Thompson, D. R. Repaske, L. S. Cutler and P. M. Epstein (1994). "A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain." Biochem Biophys Res Commun **205**(3): 1850-1858.
- Yang, Y. C. and L. S. Kao (2013). "Regulation of sodium-calcium exchanger activity by creatine kinase." Adv Exp Med Biol **961**: 163-173.
- Yoo, B., A. Lemaire, S. Mangmool, M. J. Wolf, A. Curcio, L. Mao and H. A. Rockman (2009). "Beta1-adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(4): H1377-1386.
- Younes, A., A. E. Lyashkov, D. Graham, A. Sheydina, M. V. Volkova, M. Mitsak, T. M. Vinogradova, Y. O. Lukyanenko, Y. Li, A. M. Ruknudin, K. R. Boheler, J. van Eyk and E. G. Lakatta (2008). "Ca(2+) -stimulated basal adenylyl cyclase activity localization in

membrane lipid microdomains of cardiac sinoatrial nodal pacemaker cells." J Biol Chem **283**(21): 14461-14468.

Yuan, C., Y. Guo, R. Ravi, K. Przyklenk, N. Shilkofski, R. Diez, R. N. Cole and A. M. Murphy (2006). "Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon myocardial stunning in canine and rat hearts-- evidence for novel phosphorylation sites." Proteomics **6**(14): 4176-4186.

Yuan, W. and D. M. Bers (1994). "Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase." Am J Physiol **267**(3 Pt 2): H982-993.

Yuan, W., K. S. Ginsburg and D. M. Bers (1996). "Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes." J Physiol **493** (Pt 3): 733-746.

Zaccolo, M. and M. A. Movsesian (2007). "cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology." Circ Res **100**(11): 1569-1578.

Zalk, R., O. B. Clarke, A. des Georges, R. A. Grassucci, S. Reiken, F. Mancina, W. A. Hendrickson, J. Frank and A. R. Marks (2015). "Structure of a mammalian ryanodine receptor." Nature **517**(7532): 44-49.

Zhang, J. Z., Y. Wu, B. Y. Williams, G. Rodney, F. Mandel, G. M. Strasburg and S. L. Hamilton (1999). "Oxidation of the skeletal muscle Ca²⁺ release channel alters calmodulin binding." Am J Physiol **276**(1 Pt 1): C46-53.

Zhang, L., J. Kelley, G. Schmeisser, Y. M. Kobayashi and L. R. Jones (1997). "Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane." J Biol Chem **272**(37): 23389-23397.

Zhang, T., E. N. Johnson, Y. Gu, M. R. Morissette, V. P. Sah, M. S. Gigena, D. D. Belke, W. H. Dillmann, T. B. Rogers, H. Schulman, J. Ross, Jr. and J. H. Brown (2002). "The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity." J Biol Chem **277**(2): 1261-1267.

Zhang, X., C. Szeto, E. Gao, M. Tang, J. Jin, Q. Fu, C. Makarewich, X. Ai, Y. Li, A. Tang, J. Wang, H. Gao, F. Wang, X. J. Ge, S. P. Kunapuli, L. Zhou, C. Zeng, K. Y. Xiang and X. Chen (2013). "Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic beta-adrenergic signaling." Circ Res **112**(3): 498-509.

Zhang, X., Y. N. Tallini, Z. Chen, L. Gan, B. Wei, R. Doran, L. Miao, H. B. Xin, M. I. Kotlikoff and G. Ji (2009). "Dissociation of FKBP12.6 from ryanodine receptor type 2 is regulated by cyclic ADP-ribose but not beta-adrenergic stimulation in mouse cardiomyocytes." Cardiovasc Res **84**(2): 253-262.

Zhang, Y. H. and J. C. Hancox (2009). "Regulation of cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger activity by protein kinase phosphorylation--still a paradox?" Cell Calcium **45**(1): 1-10.

Zhao, W., Y. Uehara, G. Chu, Q. Song, J. Qian, K. Young and E. G. Kranias (2004). "Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility." J Mol Cell Cardiol **37**(2): 607-612.

Zhu, W. Z., S. Q. Wang, K. Chakir, D. Yang, T. Zhang, J. H. Brown, E. Devic, B. K. Kobilka, H. Cheng and R. P. Xiao (2003). "Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II." J Clin Invest **111**(5): 617-625.

Zhu, W. Z., M. Zheng, W. J. Koch, R. J. Lefkowitz, B. K. Kobilka and R. P. Xiao (2001). "Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1607-1612.

Zimanyi, I., E. Buck, J. J. Abramson, M. M. Mack and I. N. Pessah (1992). "Ryanodine induces persistent inactivation of the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum." Mol Pharmacol **42**(6): 1049-1057.

Zimmermann, W., H. Scholz, C. Schumacher, H. Wenzlaff and A. Haverich (1994). "Effects of saterinone and its enantiomers R(+)-saterinone and S(-)-saterinone on the phosphodiesterase isoenzymes from ventricular tissue of failing human hearts and porcine hearts." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **349**(6): 611-618.

Zissimopoulos, S., N. Docrat and F. A. Lai (2007). "Redox sensitivity of the ryanodine receptor interaction with FK506-binding protein." J Biol Chem **282**(10): 6976-6983.

Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, K. Deisseroth, R. W. Tsien and H. Reuter (1999). "Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels." Nature **399**(6732): 159-162.

Zuhlke, R. D. and H. Reuter (1998). "Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3287-3294.

◆ Résumé de la thèse :

Lors d'une stimulation β -adrénergique, l'inhibition des phosphodiésterases (PDE) provoque un effet inotrope positif *via* la PKA mais induit des événements calciques spontanés pro-arythmiques à la fois *via* la PKA et la CaMKII. L'utilisation d'inhibiteurs de la CaMKII en complément d'inhibiteurs des PDE pourrait limiter les arythmies tout en préservant l'effet inotrope positif des inhibiteurs de PDE.

◆ Mots clés :

arythmies, récepteurs β -adrénergiques, AMPc, phosphodiésterases

◆ Laboratoire de recherche :

Signalisation et physiopathologie cardiovasculaires, INSERM UMR-S 1180 - LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex